

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«ТЮМЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ
Кафедра экологии и генетики

Заведующий кафедрой
д-р биол. наук, профессор
И.В. Пак

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
магистра

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФАГОЦИТАРНОЙ АКТИВНОСТИ С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ШТАММА *E. coli*, СИНТЕЗИРУЮЩЕГО ЗЕЛЕНЬ
ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ БЕЛОК

06.04.01 Биология

Магистерская программа «Экологическая генетика»

Выполнила работу
студентка 2 курса
очной формы обучения

Белич Светлана Александровна

Научный руководитель
канд. биол. наук, доцент

Трофимов Олег Владимирович

Рецензент
канд. биол. наук, доцент, доцент
кафедры анатомии и физиологии
человека и животных ФГАОУ ВО
«Тюменский государственный
университет»

Дубровский Виталий Николаевич

Тюмень
2020

АННОТАЦИЯ

с. 52, рис. 10, табл. 4, библи. 65.

Разработан метод оценки фагоцитарной активности нейтрофилов с применением бактерий *E. coli* BL21(DE3), содержащих зеленый флуоресцентный белок. Продemonстрировано, что предварительная фиксация препаратов не препятствует сохранению флуоресцентных свойств, как бактериальных, так и фагоцитирующих клеток. Показано, что оптимальным объемным соотношением культуры бактерий и цельной крови при проведении анализа является 1:1, а добавление избытка бактерий не влияет на фагоцитарную активность. Установлено, что продление времени инкубации экспериментальных образцов на 1 час приводит к достоверному увеличению фагоцитарного индекса примерно в 1,5 раза. Значения фагоцитарного индекса, определенные с помощью традиционного (нефлуоресцентного) метода, достоверно выше аналогичных показателей, полученных с использованием разработанного метода.

Ключевые слова: фагоцитоз, фагоцитарная активность, нейтрофилы, флуоресценция, зеленый флуоресцентный белок.

ANNOTATION

The phagocytic activity of neutrophils assessment method using *E. coli* BL21 (DE3) contained green fluorescent protein has been developed. It was demonstrated that preliminary fixation of the preparations did not prevent the preservation of the fluorescent properties of bacterial and phagocytic cells. During the analysis it was shown that the optimal volumetric ratio between the bacteria's culture and blood was 1:1, and the addition of bacteria's excess did not affect the phagocytic activity. It was found that prolonging the incubation time of experimental samples for 1 hour leads to a reliable increase in 1.5 times the phagocytic index. The values of the phagocytic index that were determined with the traditional (non-fluorescence) method were reliable higher than similar values that were obtained with the developed method.

Key words: phagocytosis, phagocytic activity, neutrophils, fluorescence, green fluorescent protein.

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1. Фагоцитоз	8
1.1.1. Понятие фагоцитоза	8
1.1.2. Стадии процесса	10
1.2. Характеристика фагоцитирующих клеток	13
1.2.1. Нейтрофилы	13
1.2.2. Моноциты-макрофаги	15
1.3. Методы исследования фагоцитарной активности	17
1.3.1. Числовые характеристики фагоцитарного процесса	17
1.3.2. Микроскопический метод	18
1.3.3. Микробиологический метод	19
1.3.4. Радиометрический метод	20
1.3.5. Цитофлюориметрический метод	21
1.3.6. Хеми- и билюминесцентные методы	21
1.4. Зеленый флуоресцентный белок	23
1.4.1. История открытия и применения	23
1.4.2. Классификация GFP-подобных белков	27
1.4.3. Химическая структура и спектральные свойства	27
1.4.4. Биологическая функция	29
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	31
2.1. Микроорганизмы, используемые в работе	31
2.2. Микробиологические среды и условия культивирования <i>E. coli</i>	32
2.3. Приготовление фагоцитирующей смеси	33
2.4. Приготовление мазков	34
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	36
ВЫВОДЫ	45
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	46

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АФК – активные формы кислорода;
- Г-КСФ – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор;
- ГМ-КСФ – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор;
- МФС – моноклеарная фагоцитарная система;
- ПМЯЛ – полиморфно-ядерные лейкоциты;
- ПМЯН – полиморфно-ядерные нейтрофилы
- ПЦР – полимеразная цепная реакция;
- СКК – стволовая клетка крови;
- ФИ – фагоцитарный индекс;
- ФЧ – фагоцитарное число;
- asCP, KFP – kindling fluorescent protein, белок, способный к обратимой фотоактивации из хромо- (нефлуоресцентного) состояния во флуоресцентное
- mcavFP, rfloFP, DendFP, Kaede, EosFP – белки, способные к необратимой фотоконверсии из зеленой формы в красную;
- avGFP – мутантная форма зелёного флуоресцентного белка;
- DsRed – красный флуоресцентный белок;
- GFP – green fluorescent protein или зелёный флуоресцентный белок;
- HLA – человеческие лейкоцитарные антигены, или система гистосовместимости;
- IL – интерлейкин;
- IgG-Fcγ – рецептор 1 типа для активных цитокинов, вырабатываемых иммунными лимфоцитами;
- PAF – Platelet aggregation factor или фактор активации тромбоцитов;
- TNF-α – фактор некроза опухолей.

ВВЕДЕНИЕ

Оценка способности клеток к фагоцитозу представляет собой метод исследований, который интенсивно используется в современной клинико-иммунологической диагностике, поскольку именно фагоциты, обладая исключительной реактивностью и высокой мобилизационной готовностью, составляют первую линию эффекторных механизмов иммунитета. [Олиферук, Ильинская, Пинегин, № 1, с. 10–12.]

Определение фагоцитирующей способности используется в диагностике таких заболеваний, как хроническая гранулематозная болезнь [Фундаментальная наука в современной медицине, 2018, с. 368-372.], [ХГБ <https://ipopi.org/>], синдром Чедиака – Хигаси [Kaplan, De Domenico, Ward, V. 15, p. 22–29], [Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза, 2014], а также других заболеваний и патологических состояний, сопровождающихся дефектами фагоцитоза. Из этого следует, что способность клеток к полноценному фагоцитозу является объектом научных исследований иммунного статуса и иммунокоррекционных мероприятий [Брюхин, Шаврина, выпуск 29, с. 85-89], [Инфекция и иммунитет, Т. 2, № 4, с. 723–728], [Инфекционный процесс, <https://www.rae.ru/ru/publishing/mono07.html>].

Поскольку технологии флуоресцентной микроскопии позволяют визуализировать многие биологические процессы, следует отметить их бурное развитие в последние годы [Божанова, с. 37], [Барыкина, с.65], [Соколова, с. 48]. Одним из важнейших инструментов изучения живой клетки являются флуоресцентные маркеры, дающие возможность проводить наблюдение за целевыми структурами или процессами в режиме реального времени. Особенно широко используются генетически кодируемые метки — флуоресцентные белки семейства зеленого флуоресцентного белка GFP, формирующие хромофорную группу внутри молекулы белка за счет посттрансляционных модификаций собственных аминокислотных остатков. Исследования последних лет показали большое разнообразие спектральных

характеристик и структур хромофоров в GFP-подобных белках [Дерябин, №2, с.192], [Вестник Московского Университета. сер. 16., Т. 73., № 2. С. 85–92.], [Бюллетень медицинских Интернет-конференций, www.medconfer.com], [Проблемы особо опасных инфекций, №4, с.61-66]

Цель работы: разработать метод оценки фагоцитарной активности нейтрофилов с применением флуоресцирующих бактерий.

Задачи:

1. Оценить способность клеток к флуоресценции после фиксации мазков.
2. Выбрать оптимальное соотношение количества бактерий и объема анализируемого образца крови.
3. Оценить фагоцитарную активность нейтрофилов при различной продолжительности инкубации экспериментальных образцов.
4. Сравнить результаты определения фагоцитарной активности традиционным (нефлуоресцентным) и разработанным нами (флуоресцентным) методами.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Фагоцитоз

1.1.1. Понятие фагоцитоза

Фагоцитоз – это процесс, характеризующийся поглощением крупных комплексов макромолекул или корпускулярных структур клеткой. К фагоцитам относятся полиморфноядерные нейтрофилы и моноциты-макрофаги.

Целью фагоцитоза является полное биохимическое расщепление до мелких метаболитов содержимого фагоцитом. Данные процессы обуславливаются наличием специальных ферментных систем [Вестник ВГУ, № 3, с. 24-25]. В норме нейтрофилы не выходят из сосудов в периферические ткани, но первыми направляются в очаг воспаления [Липунова, с. 113].

С момента открытия процесса фагоцитоза И. И. Мечниковым считалось, что основные функции нейтрофильных гранулоцитов - поглощение и удаление из организма различных чужеродных агентов и патогенных микроорганизмов с помощью большого количества активных кислородных метаболитов, производимых в процессе респираторного взрыва. [Мечников, с. 245-365] Фагоцитарная активность нейтрофильных гранулоцитов напрямую зависит от количества и плотности распределения на поверхности клеточной мембраны рецепторов: CD11b/CD18, CD16, CD32, CD95 [Immunology, V. 33, №2, p.193].

В последние годы стало известно, что фагоцитарные реакции нейтрофилов являются частью комплекса реакций, направленных на поддержание гомеостаза [Jeevan, Ganesh, V. 32, № 10, p. 5227-5237] [Molecular Cancer, V. 16, p. 137] [Front. Immunol., V. 16, p. 1-13] Реализация эффекторного потенциала нейтрофилов происходит не только посредством фагоцитоза, но и секрецией растворимых регуляторных продуктов – лейкотриенов, простагландинов, интерферонов, интерлейкинов, АФК и др. [J. Immunol. Methods, V. 14, № 4, p. 304].

Нейтрофилы тесно взаимодействуют практически со всеми компонентами гуморальных и клеточных систем крови и соединительной ткани, участвующими в сохранении постоянства внутренней среды [Нестерова, Колесникова, № 4, с. 8-9].

Моноциты являются транспортной формой, и их основная цель – расселение в ткани организма для того, чтобы стать макрофагами. Макрофаги локализируются в рыхлой соединительной ткани, а также в паренхиме органов и по ходу кровеносных сосудов. Макрофаги печени называют купферовскими клетками, макрофаги мозга – микроглией, легких – альвеолярными и интерстициальными. Первоначально расселившиеся по тканям моноциты становятся «резидентами» – тканевыми макрофагами, не имеющими функциональной активности. Активация макрофагов происходит с участием неспецифических раздражителей, системы комплемента, которая при локальной активации образует воспалительные макрофаги. Способность к киллингу внутриклеточных паразитов приобретает в результате активации под действием γ -интерферона, продуцируемым активированными Т-лимфоцитами. Также наблюдается способность к фагоцитарной кинетике: ПМЯН способны совершать фагоцитоз один раз, при этом они полностью разрушают антиген и погибают, а макрофаги могут фагоцитировать многократно, разрушая антиген до иммуногенных фрагментов и презентируют его на мембране [Brinkmann, V. 303, p. 1533]. Известны рецепторные структуры на клеточной мембране макрофагов, отличающие их от моноцитов крови: рецепторы для комплемента – CR3 (интегрин CD 11C/CD 18), CR4 (CD11b/CD18); рецептор, связывающий маннозу; молекула CD14 – рецептор для комплексов бактериальных липополисахаридов с липополисахаридсвязывающим протеином сыворотки; рецептор для производных лигандов сиаловых кислот – его называют «scavenger receptor» – рецептор для уборки мусора (погибших и деградирующих собственных клеток); рецептор для хвостов (Fc-фрагментов) IgG-Fc γ – рецептор 1 типа;

рецепторы для активных цитокинов, вырабатываемых иммунными лимфоцитами [Липунова, с. 161].

1.1.2. Стадии процесса

Фагоцитарный процесс состоит из нескольких стадий: миграции к очагу инфекции (пассивная по кровотоку и активная за счет хемотаксиса) [Фримель, с. 154] или движения [Липунова, с. 119], адгезии, дегрануляции, образования активных форм кислорода и азота, киллинга и расщепления объекта фагоцитоза.

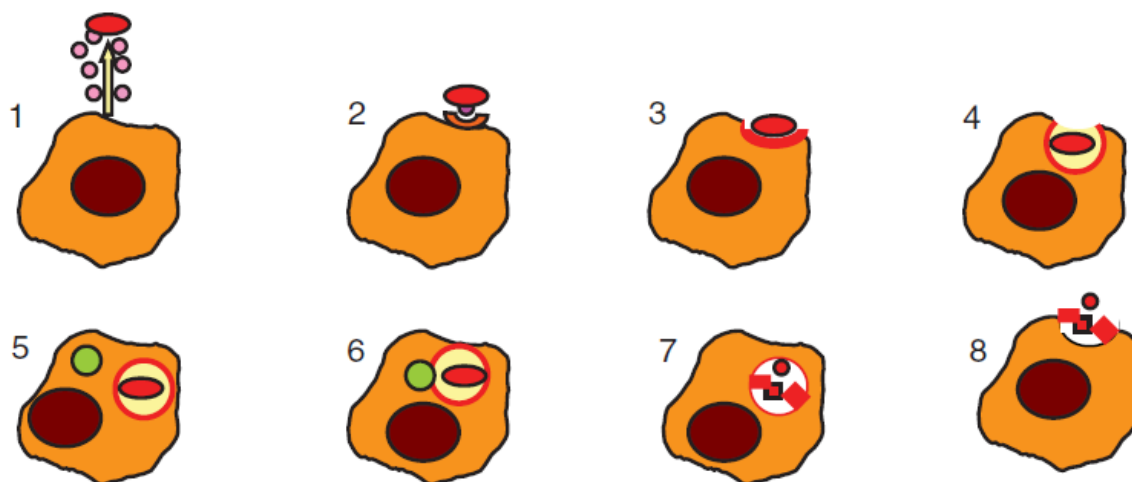


Рис.1. Стадии фагоцитоза: 1 – хемотаксис; 2 – адгезия; 3 – активация мембраны; 4 – погружение; 5 – образование фагосомы; 6 – слияние фагосомы и лизосомы; 7 – киллинг и расщепление; 8 – выброс продуктов деградации [Ярилин, с. 123]

Хемоаттрактанты стимулируют движение фагоцитов, к ним относятся N-формилпептиды бактериального происхождения, наиболее известным считается пептид N-формил-метионил-лейцил-фенилаланил (fMLP) и его аналоги, обладающие очень сильным хемотаксическим действием. Этот пептид участвует в инициации синтеза белка у бактерий. Он отсутствует в эукариотических клетках и его появление служит сигналом бактериальной инфекции.

Другую группу хемотаксических факторов формируют разнообразные провоспалительные факторы пептидной, белковой и липидной природы,

образующиеся в очаге воспаления. Среди них наиболее изучены малые фрагменты компонентов комплемента (C3a и C5a), лейкотриены и цитокины. Хемотаксическим действием обладают многие другие молекулы, образующиеся в очаге воспаления, а также продукты расщепления факторов свертывания крови и фибринолиза (тромбин, фибрин), нейропептиды, фрагменты иммуноглобулинов, пентраксины (С-реактивный белок, сывороточный амилоид), фактор агрегации тромбоцитов — РАФ. Ряд цитокинов (особенно провоспалительных) также оказывает на лейкоциты хемотаксическое действие. Их называют хемокинами. Имобилизация хемокинов в тканях важна для создания их градиента, необходимого для направленного движения клеток [Ярилин, с. 106]. Все эти вещества накапливаются в очаге воспаления и привлекают фагоциты. Хемоаттрактанты изменяют скорость движения в любом направлении — хемокинез, либо по направлению градиента концентрации фактора — хемотаксис [Липунова, с. 125]. В отсутствие хемотаксического раздражения фагоциты движутся беспорядочно [Фримель, с. 170]. Хемотаксис позволяет клеткам аккумулироваться в зоне локализации патогенных агентов, злокачественных клеток, воспаления [Хаитов, с. 156]

Фагоцитирующие клетки имеют тенденцию к адгезии на твердых поверхностях. Чем меньше отрицательный потенциал клетки, тем легче адгезия. Адгезия фагоцитов зависит от интенсивности метаболизма и от температуры [Фримель, с. 188], [Галкин, Демидова, т. 131, № 1, с. 62–78]

За адгезивные свойства фагоцитов отвечают поверхностные рецепторы — селектины (CD62L, CD62E) и интегрины, имеющие общую CD18 цепь и разные CD11a, CD 11b, CD11c цепи [Хаитов, с. 172].

Обязательным условием адгезии фагоцита служит распознавание объекта фагоцитоза. Механизмы распознавания разнообразны и принципиально различаются в случаях фагоцитоза опсонизированного и неопсонизированного объектов. Распознавание фагоцитом предварительно опсонизированных клеток более типично для инфекционных процессов. Под

опсонизацией (от греч. οψονεο — подготавливать пищу) понимают обволакивание частицы молекулами, облегчающими ее распознавание и поглощение фагоцитом [Ярилин, с. 129]. Фагоцитируемый материал вначале адсорбируется на поверхности фагоцита. В месте контакта с бактерией мембраны фагоцита формируют углубление [Хаитов, с. 180], которое называют «фагоцитарной чашей» [Ярилин, с. 130], происходит образование псевдоподий, в конце концов микроорганизм полностью охватывается. Взаимодействие между фагоцитом и объектом фагоцитоза имеет гидрофобный характер, поэтому некоторые вирулентные микроорганизмы в качестве механизма защиты имеют полисахаридную капсулу, которая снижает гидрофобность и эффективность адгезии [Хаитов, с. 185].

Стадия дегрануляции заключается в слиянии фagosомы-вакуоли, содержащей объект фагоцитоза, с лизосомами. В результате происходит образование фаголизосомы, в которой происходят процессы киллинга и расщепление частиц. Первыми в фagosому вливают свое содержимое специфические гранулы, содержащие лизоцим, лактоферрин и белок, связывающий витамин В12. Вторыми вливают азурофильные гранулы, содержащие набор гидролаз, миелопероксидазу. Киллинг поглощенных микроорганизмов осуществляется системами ферментативной и неферментативной природы [Ярилин, с. 133] активность которых, может быть обусловлена защитными механизмами, подразделяющимися на кислородзависимые и кислороднезависимые механизмы [Фримель, с. 191].

Специальные ферментные системы генерируют образование реакционноспособных свободных радикалов кислорода (O^{2-} , $O\cdot$), а также перекиси водорода. Фермент NO-синтетаза генерирует образование радикала оксида азота ($NO\cdot$). Эти радикалы осуществляют деструктивные реакции к фагоцитированному объекту [Вестник ВГУ, № 3, с. 24-25]. Конечное назначение фагоцитоза состоит в создании оптимальных условий для киллинга и цитолиза патогенов, т.е. в осуществлении внутриклеточного цитолиза. Поэтому эффективность фагоцитоза обусловлена не столько

поглощением патогена, сколько его разрушением внутри клетки. В зависимости от реализации бактерицидных свойств, различают завершённый и незавершённый фагоцитоз. Только первый отвечает своему биологическому предназначению и может рассматриваться как эффективная защитная реакция — проявление врождённого иммунитета [Ярилин, с. 138]. При незавершённом процессе наблюдается хроническое воспаление. При этом в месте высвобождения антигена происходит скопление макрофагов, выделяющих фиброгенные факторы и стимулирующих образование грануломы, что является попыткой организма организовать очаг воспаления. Макрофаги и нейтрофилы, активированные микробными продуктами, начинают продуцировать цитокины и другие биологически активные медиаторы. Макрофаги продуцируют IL-1, 6, 8, 12, TNF- α , простагландины, лейкотриен – фактор, активирующий тромбоциты. Нейтрофилы продуцируют TNF- α , IL-12, IL-8, лейкотриен, PAF [Хаитов, с. 198].

1.2. Характеристика фагоцитирующих клеток

1.2.1. Нейтрофилы

Нейтрофилы являются самой многочисленной группой циркулирующих лейкоцитов. В связи с наличием характерного сегментированного ядра нейтрофилы называют полиморфно-ядерными лейкоцитами. ПМЯЛ мигрируют в очаги инфекции, где происходит распознавание, захват и уничтожение бактерий [Хаитов, с. 74]. В кровотоке присутствует только 1–2% общего числа зрелых нейтрофилов в организме (остальные представлены в тканях, преимущественно в костном мозгу). Срок их пребывания в циркуляции составляет 7–10 ч. [Ярилин, с. 53]

Размеры нейтрофильных гранулоцитов в мазках крови варьируют от 10 до 15 мкм. Плазмолемма нейтрофильных гранулоцитов выполняет рецепторную функцию, участвует в фагоцитозе и транспорте веществ (эндо- и экзоцитоз; в частности, дегрануляция). На плазмолемме находятся рецепторы адгезивных веществ, цитокинов, медиаторов воспаления,

иммуноглобулинов класса G, C3b-компонента комплемента, молекулы главного комплекса гистосовместимости (HLA).

Ядро нейтрофильных гранулоцитов имеет неодинаковое строение в зависимости от степени дифференцированности клетки. По строению ядра различают сегментоядерные, палочкоядерные и юные нейтрофильные гранулоциты. Наиболее зрелыми считают сегментоядерные нейтрофилы, для них типично дольчатое ядро, представленное 2-5 сегментами, соединенными нитевидными перетяжками. У самок около 3% таких клеток содержат хорошо выраженный мелкий придаток ядра в виде барабанной палочки, который представляет X-хромосому (половой хроматин, тельце Барра). Палочкоядерные нейтрофилы – молодые клетки (составляют 3-5% от общего числа). Их ядро в виде палочки или подковы, не сегментировано, но содержит намечающиеся перетяжки, которые углубляются по мере созревания клеток. Юные нейтрофильные гранулоциты – самые молодые клетки (составляют до 0,5% от общего количества лейкоцитов), их ядро бобовидной формы, светлее, чем у палочкоядерных и сегментоядерных форм.

Сегментоядерные нейтрофилы не являются старой, исчерпывающей свои потенции, клеткой: в определенных условиях (например, в процессе воспалительной реакции) в ней происходит возобновление синтеза РНК, в результате чего происходит трансформация нейтрофила в клетку с новыми качествами и функциональными возможностями [Антонишкис, Клиническая лабораторная диагностика, № 8, с. 23]. Цитоплазматические гранулы нейтрофилов многочисленны (50-200 в каждой клетке) и подразделяются на первичные, вторичные и третичные. Первичные (азурофильные, неспецифические) гранулы появляются на ранних стадиях развития. Это самые крупные гранулы (диаметр 400-800 нм), содержат лизоцим, миелопероксидазу, нейтральные протеиназы, кислые гидролазы, катионные антимикробные белки, бактерицидный белок, увеличивающие проницаемость. Ферменты этих гранул активны в кислой среде и

обеспечивают внутриклеточное уничтожение микробов. Вторичные (специфические) гранулы диаметром 100-300 нм, содержат лизоцим, лактоферрин, щелочную фосфатазу, коллагеназу, активатор плазминогена, адгезивные белки. Секреция этих веществ происходит в межклеточном пространстве, мобилизуются медиаторы воспаления, активируется система комплемента, происходит киллинг. Третичные гранулы (желатиназные) – диаметром 400-800 нм; главным их компонентом являются желатиназа, лизоцим и адгезивные белки. Третичные гранулы участвуют в переваривании субстратов в межклеточном пространстве. Адгезивные молекулы этих гранул участвуют в прикреплении нейтрофила к эндотелию, а желатиназа увеличивает проницаемость базальной мембраны, т.к. переваривает находящийся в ней коллаген IV типа. Нейтрофилы с кровью непрерывно поставляются в кожу, слизистые оболочки и другие периферические ткани. Их суточный оборот составляет порядка 100 млрд клеток. Нейтрофилы способны повышать свою численность, когда это необходимо организму, за счет расширения пула пролиферирующих и «рекрутирования» зрелых клеток. Расширение пула ускоряется воспалительными цитокинами: Г-КСФ, ГМ-КСФ. На пути к периферическим тканям половина внутрисосудистых гранулоцитов находится в движении, другая часть обратимо прилипает к стенкам сосудов (пристеночные клетки). При инфекции или воспалении они могут быть быстро востребованы [Хаитов, Пинегин, № 3, с. 6].

1.2.2. Моноциты-макрофаги

Моноциты присутствуют в крови в виде крупных клеток с бобовидным ядром и цитоплазмой сине-серого цвета. Размеры моноцитов в мазках – 18-20 мкм. Крупное ядро занимает до половины площади клетки, эксцентрично расположено, бобовидной формы. Цитоплазма слабобазофильная, содержит все органеллы общего значения, а также азурофильные гранулы (лизосомы), богатые гидролитическими ферментами. Антимикробные системы моноцита включают лизоцим, лактоферрин, кислую фосфатазу, арилсульфатазу, перекись водорода, окись азота (NO). Мигрировав в ткани, моноциты

превращаются в макрофаги МФС. Макрофаги участвуют в захвате, процессинге и представлении антигенов лимфоцитам при индукции клеточных и гуморальных иммунных реакций. Синтезированные ими цитокины, интерлейкины, интерфероны способствуют клеточной координации сложных взаимодействий в иммунном ответе [Ярилин, с. 64], [Хаитов, Пинегин, Ярилин, с. 152].

1.3. Методы исследования фагоцитарной активности

1.3.1. Числовые характеристики фагоцитарного процесса

Методика изучения фагоцитарной активности нейтрофилов основана на количественном определении поглотительной и переваривающей способности нейтрофилов по отношению к микробной тест-культуре. В различных работах определяемые параметры фагоцитоза обозначаются терминами, которые могут отличаться друг от друга, однако общий смысл определения искомого параметра сохраняется. Ниже приведены определения показателей, которые в полной мере характеризуют фагоцитарный процесс и наиболее часто встречаются в литературе.

1. Фагоцитарный показатель (ФП) — процент нейтрофилов, участвующих в фагоцитозе, от общего их количества. Норма: 65–100 % [Кузнецова, Чепелева, Камшилов, с. 83].

Процент фагоцитоза (ПФ) — т.е. количество клеток, захвативших 1 и более объектов фагоцитоза из 100 подсчитанных фагоцитов. Такие клетки в дальнейшем именуется «истинными фагоцитами» [Дерябин, Каримов, с. 16]

Процент фагоцитоза (ФП) — количество клеток, захвативших один или более объектов фагоцитоза на 100 потенциальных фагоцитов [Вдовиченко, Барановская №2, с. 133].

2. Фагоцитарное число (ФЧ) — среднее число микробов, поглощенных одним нейтрофилом (частное от деления общего числа поглощенных бактерий (Чп) на число клеток, вступивших в фагоцитоз (ФП)). Характеризует поглотительную способность нейтрофилов. Норма: 6–14 у. е. [Кузнецова, Чепелева, Камшилов, с. 83].

Фагоцитарное число (ФЧ) — количество объектов фагоцитоза, которое в среднем приходится на один из 100 фагоцитов, что характеризует общую поглотительную активность фагоцитов [Вдовиченко, Барановская №2, с. 133].

Фагоцитарное число (ФЧ) — среднее число дрожжевых частиц, поглощенных одним фагоцитом. Норма — 2,0–4,0 [Дерябин, Каримов, с. 16].

3. Фагоцитарный индекс (ФИ) — количество объектов фагоцитоза, которое приходится на одну фагоцитирующую клетку («истинный» фагоцит), что характеризует поглотительную активность фагоцитов.

[Вдовиченко, Барановская №2, с. 133].

Фагоцитарный индекс (ФИ) — число нейтрофилов (%), участвующих в фагоцитозе. Норма — 60,0–80,0% [Дерябин, Каримов, с. 16].

Фагоцитарный индекс (ФИ) — количество объектов фагоцитоза, которое приходится на один «истинный» фагоцит.

4. Количество активных фагоцитов (КАФ) — абсолютное число фагоцитирующих нейтрофилов. КАФ вычисляют исходя из абсолютного содержания лейкоцитов, процента нейтрофилов (Нф) в общем мазке крови и процента фагоцитоза (ФП). Норма: 1,35–6,4 (10^9 /л) [Кузнецова, Чепелева, Камшилов, с. 83].

Число активных фагоцитов (АФ) — число фагоцитов (%), содержащих хотя бы одну активно перевариваемую дрожжевую клетку. Норма — 80,0–100,0% [Дерябин, Каримов, с. 17].

5. Показатель завершенности фагоцитоза (ПЗФ) — отношение количества переваренных микробов (Чу) к общему числу поглощенных микробов (Чп), выраженное в процентах (используется для оценки переваривающей функции фагоцитов). Норма зависит от вида тест-объекта.

Индекс переваривания (ИП) — процентное отношение числа активно перевариваемых дрожжевых клеток ко всем поглощенным 100 нейтрофилами. Норма — 70,0–90,0% [Дерябин, Каримов, с. 17].

6. Абсолютный фагоцитарный показатель (АФП) (фагоцитарная емкость крови) — количество микробов, которое могут поглотить фагоциты 1 литра крови. Норма: 20–100 (10^9 /л) [Кузнецова, Чепелева, Камшилов, с. 83].

1.3.2. Микроскопический метод

Основой этого метода является определение с помощью светового микроскопа способности нейтрофилов к поглощению и перевариванию по отношению к объекту фагоцитоза после их совместной инкубации. Для

этого, взвесь фагоцитируемых микроорганизмов и фагоциты инкубируют определенное время, после чего производится подсчет процента фагоцитирующих клеток и среднее число поглощенных объектов одним фагоцитом [Хаитов, Пинегин, Ярилин, с. 179]. Исследуют мазки после 30-минутной инкубации под иммерсионной системой светового микроскопа. Так же время инкубации может различаться и в большую сторону, поскольку считается, что для реализации процессов миграции, адгезии и непосредственно фагоцитоза должно пройти не менее 30 минут [Ярилин, с. 95].

Также к микроскопическому методу можно отнести подсчет обычных (жизнеспособных) и дегенеративных (разрушенных) микроорганизмов после совместной инкубации с фагоцитами в присутствии опсонизирующей сыворотки при 37°C в течение 1 часа и последующей окраски по Романовскому-Гимзе или иными красителями [Рудик, Тихомирова, с. 81]. Недостатком микроскопического метода являются трудоемкость и в ряде случаев субъективность подсчета, особенно если в качестве объектов фагоцитоза используют отдельные микроорганизмы или частицы латекса [Горчаков, Кручинский, Горчакова, с. 8], ведь, как и любая другая биомедицинская технология с визуальной оценкой, данный способ является весьма субъективным, а потому неточным.

1.3.3. Микробиологический метод

Более надежен микробиологический метод, заключающийся в определении числа микроорганизмов, выживших после контакта с фагоцитами и за счет этого сохранивших способность к формированию изолированных колоний при выращивании на плотных питательных средах. Для его реализации готовят смесь фагоцитов и опсонизированных микроорганизмов в соотношениях от 1:1 до 1:100, инкубируют при 37°C и через различные промежутки времени отбирают пробы, из которых, предварительно разрушив фагоциты, делают высевы на питательный агар. Еще через 18-24 часа инкубации подсчитывают количество выросших

колоний, сравнивая их с таковым в контроле (посева из взвеси микроорганизмов без фагоцитов), после чего выражают киллинговую способность фагоцитов как % погибших микробных клеток. Данный способ чрезвычайно надежен, в связи с чем часто используется в качестве «золотого стандарта» при оценке киллинговой способности фагоцитов, однако достаточно трудоемок и позволяет получать результат не ранее суток от момента начала исследования [Рудик, Тихомирова, с. 85]. Наиболее современные методы оценки фагоцитоза основаны на введении в фагоцитарную систему дополнительных «меток», инструментальное исследование которых позволяет получить объективное и экспрессное представление об изучаемых явлениях.

1.3.4. Радиометрический метод

Наиболее точными и быстрыми методами определения фагоцитарной активности лейкоцитов являются радиометрические. Так, поглотительную способность оценивают по уровню включения изотопа в фагоцитирующие клетки. Для этого используют меченные Cr эритроциты, радиоактивную масляную эмульсию или микробы, меченные ^{14}C -глицином, ^3H -лейцином, ^3H -уридином, или частицы ^{192}Ir . Иногда фагоцитоз оценивают по уменьшению метки (^{32}P) во внеклеточной среде.

Радиометрические методы отличаются быстротой постановки и объективностью оценки результатов. Как правило, в конце инкубации микробов с фагоцитами последние разрушают осмотическим лизисом, замораживанием — оттаиванием или дезоксихолатом натрия, затем добавляют на 30 мин при 37°C ^3H -тимидин и подсчитывают радиоактивность осажденных на фильтре бактерий. С помощью двойной метки определяют одновременно поглотительную и бактерицидную функцию лейкоцитов. Для этого предварительно метят микробы ^3H -глюкозой или ^{14}C -аминокислотами. Радиоактивность первоначально меченых микробов, включенных в фагоциты, будет отражать их поглотительную функцию, а радиоактивность,

включенная в микробы, после разрушения фагоцитов будет характеризовать их бактерицидность.

К преимуществам данного метода следует отнести его высокую чувствительность и объективность, к недостаткам же - необходимость использования радиоактивных веществ, а также относительно высокую стоимость используемого оборудования и расходных материалов [J. Immunol. Methods, V. 14, № 4, p. 304].

1.3.5. Цитофлюориметрический метод

Метод проточной цитофлюориметрии позволяет получить представление об интенсивности киллинга бактериальных клеток при введении в фагоцитарную систему различных флюорохромов (карбоксифлюоресцеина, пропидиумаиодида и др.), флуоресцирующих красителей, связывающихся с телами клеток и при внешнем облучении сообщающих различный характер свечения. То есть принцип метода основан на том, что нейтрофил, захвативший меченый агент, сам начинает интенсивно флуоресцировать. Вследствие чего можно наблюдать различия между активными и не активными фагоцитами, что регистрируется проточным цитофлюориметром [Мазуров, Донбаева, Пинегин, № 2, с. 9], [Martin, Bhakdi, V. 30, № 9, p. 2251].

Применение подхода с использованием специального прибора – проточного цитофлюориметра – позволяет в одном измерении анализировать несколько тысяч клеток, тем самым получать максимально объективные результаты. К лимитирующим факторам его использования стоит отнести высокую стоимость оборудования и расходных материалов [Исаков, Архипова, с 241].

1.3.6. Хеми- и биолюминесцентные методы

Оценка фагоцитарной активности нейтрофилов может проводиться несколькими способами:

1. Визуальный. Под люминесцентным микроскопом подсчитывается в 100 нейтрофилах число поглощенных микроорганизмов *S. cerevisiae* с

оранжево-красной люминесценцией относительно таких же с зеленой люминесценцией. Использование именно этих дрожжей является обязательным условием выполнения метода, поскольку только живые интактные дрожжевые клетки имеют зеленую люминесценцию постоянной интенсивности при их флуорохромировании акридиновым оранжевым (АО) в низкой концентрации. Красная люминесценция характерна для активно перевариваемых дрожжей.

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

В обоих случаях расчетным путем определяются показатели фагоцитоза, представленные в п.1.3.1 [Горчаков, Кручинский, Горчакова, с. 8].

3. Измерение интенсивности биолюминесценции в процессе фагоцитоза.

Данная цель достигается путем использования в качестве объектов фагоцитоза бактерий генно-инженерного штамма *E.coli lux*, обладающих способностью к биолюминесценции и являющихся одновременно комменсалами и потенциальными патогенами.

Цельную кровь забирают из локтевой вены в стерильную пробирку, содержащую гепарин или ЭДТА, и тщательно ресуспендируют. В пластиковую пробирку внести раствор низкой плотности фиколл-верографина ($\rho 1,077$ г/мл), затем подслоить раствор высокой плотности ($\rho 1,112$ г/мл). Кровь, разбавленная в 2-3 раза физиологическим раствором, наслаивается на фиколл-верографин, всё помещается в центрифугу на 40 мин при 1700 об/мин. Нейтрофилы необходимо собрать с нижней интерфазы.

Выделенные клетки помещают в пластиковую центрифужную пробирку и дважды отмывают физиологическим раствором. Нужную концентрацию нейтрофилов получают доведением до необходимых значений.

Для оценки фагоцитарной активности в качестве объектов фагоцитоза используют различные штаммы микроорганизмов, в данном случае лиофилизированную культуру люминесцентных бактерий генно-инженерного штамма *E.coli lux⁺*. Суспензию нейтрофилов смешивают с разведенной культурой *E.coli lux⁺* в соотношении 1:10, тщательно ресуспендируют, затем измеряют билюминесценцию на 0, 10, 30 и 60 минутах инкубации при 37°C [Ширшев, с. 216].

1.4. Зеленый флуоресцентный белок

1.4.1. История открытия и применения

В 1761 г. датским зоологом Петером Форсколом было описано явление получившее название билюминесценции. Во время экспедиции на корабле по Северному морю он заметил в воде странное свечение, оказалось, что светятся небольшие (диаметром 2–3 см) медузы.

Было поймано несколько таких медуз для более тщательного изучения этого свечения. Оказалось, что, если их слегка потревожить, они начинают светиться ярким зеленым светом. Медузы получили название «эквиорея» (*Aequorea* от лат. *aqua* – вода), с этого начался долгий путь исследования процессов билюминесценции [Левицкий, № 9, с. 28].

Стоит отметить, что существуют принципиально различные процессы, позволяющие светиться живым организмам. Первый – представляет собой набор биохимических реакций с участием специальных ферментов или ферментных систем. Такое свечение называется люминесценция и использует энергию химической реакции, может продолжаться, пока не будут исчерпаны необходимые реагенты.

Второй – вещество поглощает из внешнего источника (например, дневное освещение) ультрафиолетовую часть спектра, обладающую высокой энергией. В результате молекула переходит в так называемое возбужденное

состояние, но она может пребывать в нем достаточно непродолжительно. Для возвращения к «нормальному» состоянию, молекуле необходимо избавиться от излишка энергии, полученной с ультрафиолетовым облучением, что достигается излучением света. Это и есть явление флуоресценции. Поскольку часть энергии уходит на перевод молекулы в возбужденное состояние, испускаемый свет имеет большую длину волны – сдвигается в сторону красной части спектра, что соответствует более низкой энергии. Это общее правило флуоресценции – всегда испускается свет с большей длиной волны, нежели поглощенный [Степаненко, с. 11].

При флуоресценции не требуются какие-либо реакции с участием ферментов, нужна лишь ультрафиолетовая подсветка. Именно таким свойством обладает зеленый флуоресцентный белок GFP, присутствующий в медузе экворея [Левицкий, № 9, с. 28]. Этот белок при облучении ультрафиолетом имеет голубовато-зеленое свечение.

Осаму Шимомура (Симомура) начал свои исследования с того, что сумел выделить из морского моллюска экстракт фермента люциферазы (люциферин), обеспечивающий свечение за счет биохимических реакций. Экспериментальный опыт позволил Шимомуре сосредоточить внимание на новом объекте, который испускал свечение без участия люциферина [Shimomura, Johnson, Saiga, V. 58, I. 2, 1961, P. 113-123]

В 1961 году он начал изучать биолюминесценцию медузы *Aequorea Victoria* с Фрэнком Джонсоном из университета Вашингтона. Вдоль края зонтика медузы они могли наблюдать яркое кольцо зеленого свечения при химической или механической стимуляции [Shimomura, Johnson, Saiga, V. 59, I. 3, 1962, P. 223-239].

В 1960-е годы Шимомура определил и охарактеризовал люминесцентные и флуоресцентные молекулы, ответственные за биолюминесценцию *Aequorea* [Shimomura, Johnson., 1975; V.72, I. 4, p. 1546–1549] [Shimomura, Johnson, Saiga, V. 59, I. 3, 1962, P. 223-239]. Вопросами о «необычном свечении» заинтересовались другие исследователи.

Тем временем американский нейробиолог Мартин Чалфи изучал гены, участвующие в развитии и функционировании сенсорных клеток в нематоде *Caenorhabditis elegans*. Он сразу же заинтересовался проблемой внедрения генов флуоресцентного белка в организм нематоды, в надежде выяснить, где могут быть локализованы гены в живом организме.

В сентябре 1992 года, после получения ДНК GFP от Дугласа Прашира, Чалфи попросил своего ученика, Г. Ойскирхен внедрить GFP в *E.coli*, не зная, что некоторые другие лаборатории также пытались выполнить данные манипуляции с белком, однако без успеха. Чалфи и Ойскирхен использовали ПЦР для амплификации только кодирующей последовательности GFP. Эта работа продемонстрировала, что для флуоресценции не требуется других компонентов, кроме самого GFP. На самом деле, трудность, с которой сталкивались другие лаборатории, вытекает из использования рестриктазы для субклонирования, что принесло с собой дополнительную последовательность, которая препятствовала экспрессии флуоресцентного белка. После успешного эксперимента Ойскирхен, техник Чалфи Юань Ту продолжал внедрять GFP в организм *Caenorhabditis elegans*, впоследствии опубликовав результаты в 1994 году в журнале «Science». На титульной странице читатели могли увидеть образ *C. Elegans*, в котором нейроны сенсорного рецептора светились ярко-зеленым светом [Science V. 263, I.5148, p. 802-805].

Флуоресцентные белки семейства GFP стали одним из основных инструментов, используемых в клеточных технологиях [Albrecht, Jungi, V. 54, p. 300], так как широкому применению GFP способствуют его уникальные свойства: низкая токсичность, достаточно высокая рН-стабильность и высокая яркость флуоресцентного сигнала [Ямпольский, с. 4], [Пахомов, № 5, с. 15].

Всего к настоящему времени клонировано около 200 генов флуоресцентных белков (FPs) и хромопротеинов (CPs), в основном и класса

Anthozoa и Hydrozoa типа Cnidaria, и их число постоянно растёт [Шемякина, с. 16], [Пахомов, № 5, с. 15].

1.4.2. Классификация GFP-подобных белков

Открытие GFP-подобных белков из коралловых полипов класса *Anthozoa* позволило существенно расширить палитру флуоресцентных белков. Эти белки имеют степень гомологии с GFP около 30 %, а один из клонированных белков - DsRed имел яркую флуоресценцию в красной области спектра (583 нм). Позже число GFP-подобных белков расширилось до нескольких десятков. Некоторые из белков коралловых полипов обладали уникальными свойствами, нехарактерными для GFP. К примеру, asCP оказался способным к обратимой фотоактивации из хромо- (нефлуоресцентного) состояния во флуоресцентное, а ряд белков (mCavFP, rFloFP, DendFP, Kaede, EosFP) оказались способными к необратимой фотоконверсии из зеленой формы в красную [Шемякина, с. 33], Такая особенность новых белков позволила получить генетически кодируемые флуоресцентные метки для прицельного фотомечения белков *in vivo* [Клеточная трансплантология и тканевая инженерия, т. 8, № 4, с.33-38]

К настоящему времени основной классификацией GFP-подобных белков является классификация по цвету испускаемого ими цвета: от синего до красного. В особую группу можно выделить хромобелки, которые не имеют собственной флуоресценции, однако характеризуются интенсивным поглощением в красной области спектра. Имеется также одна интересная особенность, - все хромобелки превращаются во флуоресцентные с помощью мутагенеза при небольшом числе замен [Ямпольский, с. 13], они имеют максимум эмиссии в дальне-красной области спектра, таким образом, хромобелки, исходя из классификации по положению максимумов поглощения/эмиссии, могут быть отнесены к дальне-красным белкам.

1.4.3. Химическая структура и спектральные свойства

В значительной степени востребованность GFP-белков обусловлена их необычным свойством – автокаталитически синтезировать хромофор их собственных аминокислот [Chalfie, V.106, № 25, p. 358], без каких-либо субстратов, кроме молекулярного кислорода [Shimomura, V.18, № 3, p. 220],

[Tsien, V. 67, № 5, p. 162]. В отличие от обычных ферментов, производящих какую-либо одну реакцию множество раз, флуоресцентные белки в ходе своего созревания один раз проводят 2-3 совершенно разные реакции, приводящих к синтезу хромофора внутри молекулы белка за счет посттрансляционных модификаций собственных аминокислотных остатков [Wachter, V. 6, № 10, p. 1269].

Синтез хромофора происходит внутри белка, причем окружающие его аминокислотные остатки выполняют каталитическую функцию. Кроме того, они оказывают значительное влияние на спектральные свойства [Tsien, V. 67, № 5, p. 171]. Хромофор флуоресцентных белков образуется в результате автокаталитической циклизации трех аминокислотных остатков в положении 65-67 [Chalfie, V.106, № 25, p. 358]. В avGFP хромофор образован аминокислотами Ser 65, Tyr 66 и Gly 67. Хотя такая аминокислотная последовательность встречается и в других белках, в них хромофор не образуется, что говорит о решающей роли пространственной структуры белка в образовании хромофора [Шемякина, с. 54]. Безусловно, крайне существенно то, что хромофор расположен внутри β - бочонка. Установлено, что скорость созревания хромофора, его спектральные свойства определяются рядом аминокислотных остатков, входящих в состав его микроокружения. В разных белках одной и той же цветовой группы положение максимума эмиссии может меняться в пределах нескольких десятков нанометров в зависимости от аминокислотного окружения [Степаненко, с. 14].

К примеру, остаток Arg 96 присутствует во всех флуоресцентных белках и находится в непосредственной близости от кислорода имидазолинона. Считается, что основная роль Arg 96 состоит в ускорении созревания хромофора и что определяющую роль играет положительный заряд остатка. Хотя влияние Arg 96 на скорость формирования хромофора обсуждалось еще в работе Цьена [Tsien, V. 67, № 5, p. 148], до настоящего времени не было проведено систематического изучения структуры и

стабильности мутантных белков с аминокислотными заменами по этому остатку.

Пространственная структура GFP представляет собой β -бочонок, образованный одиннадцатью β -слоями, внутри которого расположена α -спираль, несущая хромофор. Петли и короткие α -спиральные участки закрывают бочонок сверху и снизу. Химически хромофор GFP является 4-(п-гидроксibenзилиден)имидазол-5-оном [Biochemistry, V. 23, p. 122]. Аминокислотные замены в положении 96 в зеленом флуоресцентном белке влияют на возможность сворачивания, скорость сворачивания, структуру и устойчивость к денатурирующим воздействиям этого белка.

Флуоресцентные белки, с топологией нативной структуры типа β -бочонка характеризуются более высокой устойчивостью к действию химических денатурантов и нагреванию по сравнению с глобулярными α -спиральными белками [Шемякина, с. 73].

Третичная структура белка GFP, благодаря своей компактности, создаёт оптимальные условия для защиты хромофора от внешних воздействий, чем объясняется высокая стабильность флуоресценции, устойчивость белка к действию протеаз, изменению pH и температуры. Денатурация белка, как и следовало ожидать, разрушает флуоресценцию [Ward, V. 6, № 8, p. 49], а мутации аминокислотных остатков, находящихся в непосредственной близости от хромофора, могут значительно изменить флуоресцентные свойства белка [PNAS of the USA, V. 35, p. 136].

1.4.4. Биологическая функция

Несмотря на многочисленные работы, посвященные анализу структуры флуоресцентных белков, их биологическая функция остается малоизученной. Предполагаемые функции флуоресценции можно охарактеризовать следующим образом: модуляция, либо участие в фотосинтезе и визуальная коммуникация. К первому могут относиться рифообразующие кораллы, в которых часто присутствуют водоросли симбионтов [Nature, V. 408, p. 851]. Данные о том, что флуоресцентные белки иногда выступают в качестве

доноров электронов, указывают на возможность их участия в том или ином виде фоторецепции, продукции восстановительных эквивалентов [Nature chemical Biology, V. 5, p. 460].

Функцию визуальной коммуникации чаще всего связывают с GFP в биолюминесцентных организмах, таких как *Aequorea victoria* или *Renilla reniformis* [Journal of Cellular Physiology, V. 60, № 1, p. 92]. В этих организмах зелёный флуоресцентный белок сопряжён с люциферазой и преобразует синюю люминесценцию в зелёный свет посредством резонансного переноса энергии [Morin, Hastings, V. 77, № 3, p. 315].

Несмотря на различные гипотезы о биологической функции флуоресцентных белков, на данный момент остается не до конца ясным, связана ли основная функция данных белков с их флуоресцентными свойствами, или флуоресценция является побочным эффектом других функциональных свойств.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Настоящие исследования проводились в Центре биотехнологии и генодиагностики Института биологии Тюменского государственного университета в период с 2017 по 2020 гг.

2.1. Микроорганизмы, используемые в работе

При разработке метода определения фагоцитарной активности использовали штамм *Escherichia coli* BL21(DE3), трансформированный плазмидой pRQSTEP-GFP (рис. 1). В данном штамме отсутствуют *lon* и *ompT* протеазы для предотвращения расщепления экспрессируемого белка. Штамм лизогенен по фагу λ (DE3), который содержит ген T7 RNA полимеразы под контролем *lacUV5* промотора (индукторы – IPTG, галактоза; репрессор – глюкоза).

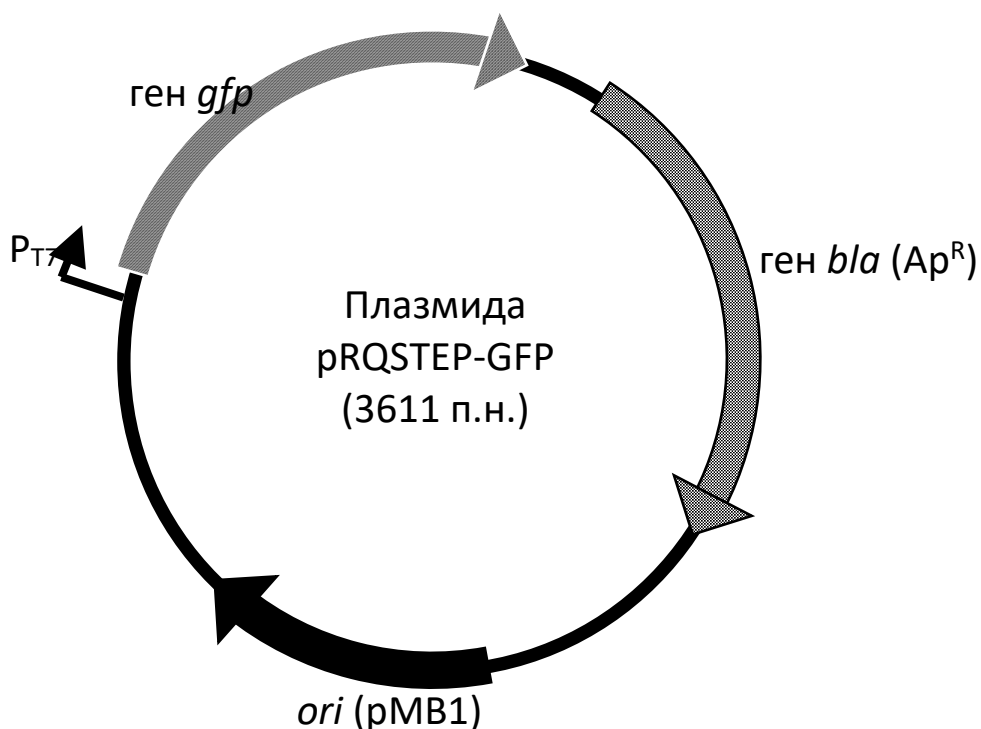


Рис. 2. Схема строения плазмиды pRQSTEP-GFP

В состав плазмиды pRQSTEP-GFP входит ген β -лактамазы, который определяет устойчивость клеток к ампициллину, а также полноразмерный ген зеленого флуоресцентного белка (GFP) под контролем промотора РНК-

полимеразы бактериофага T7. Наличие данного промотора позволяет избирательно экспрессировать GFP в клетках, содержащих ген T7 RNA полимеразы, в результате чего бактерии приобретают способность флуоресцировать в ультрафиолетовом свете (рис. 2).



Рис. 3. Зеленая флуоресценция используемого в работе штамма *Escherichia coli* BL21(DE3), трансформированных плазмидой pRQSTEP-GFP (получен ранее Райхерт Е.А.)

2.2. Микробиологические среды и условия культивирования *E. coli*

Для культивирования использовали LB среду следующего состава: 1% триптона (Difco), 0,5% дрожжевого экстракта (Difco) и 1% NaCl. Для получения твердой LB-среды к вышеуказанным компонентам добавляли агар (Ferak) до 1,5%. Твердые и жидкие среды стерилизовали с использованием автоклава Tuttnauer.

Культивирование в жидкой питательной среде проводили в шейкере-инкубаторе Innova 43R («New Brunswick Scientific») при 37°C и 140 об./мин. В пробирках содержащих по 5 мл среды (рис. 4).

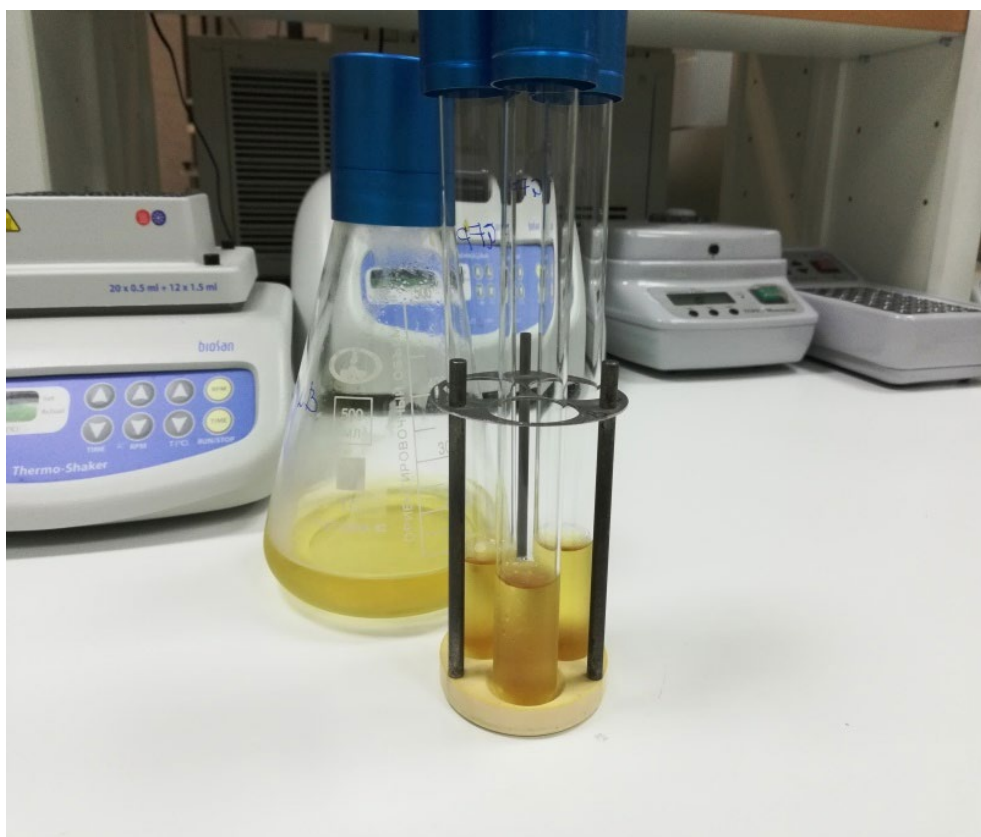


Рис. 4. Микроорганизмы, выращенные в жидких питательных средах

Культивирование клеток на поверхности твердых питательных сред осуществляли в термостате BD53 («Binder») в чашках Петри диаметром 90 мм. При культивировании клеток *E. coli* BL21(DE3), трансформированных плазмидой pRQSTEP-GFP, использовали питательные среды, содержащие ампициллин. Для этого в автоклавированные среды добавляли ампициллин в концентрации 1 мкл/мл.

2.3. Приготовление фагоцитирующей смеси

Кровь для приготовления фагоцитирующих смесей была любезно предоставлена ФБУН «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора». К цельной крови добавляли субстрат (ночную культуру *E. coli* BL21(DE3)), тщательно

перемешивали и инкубировали в шейкере-инкубаторе Biosan при температуре 37°C от 1 до 2 часов (рис. 5).

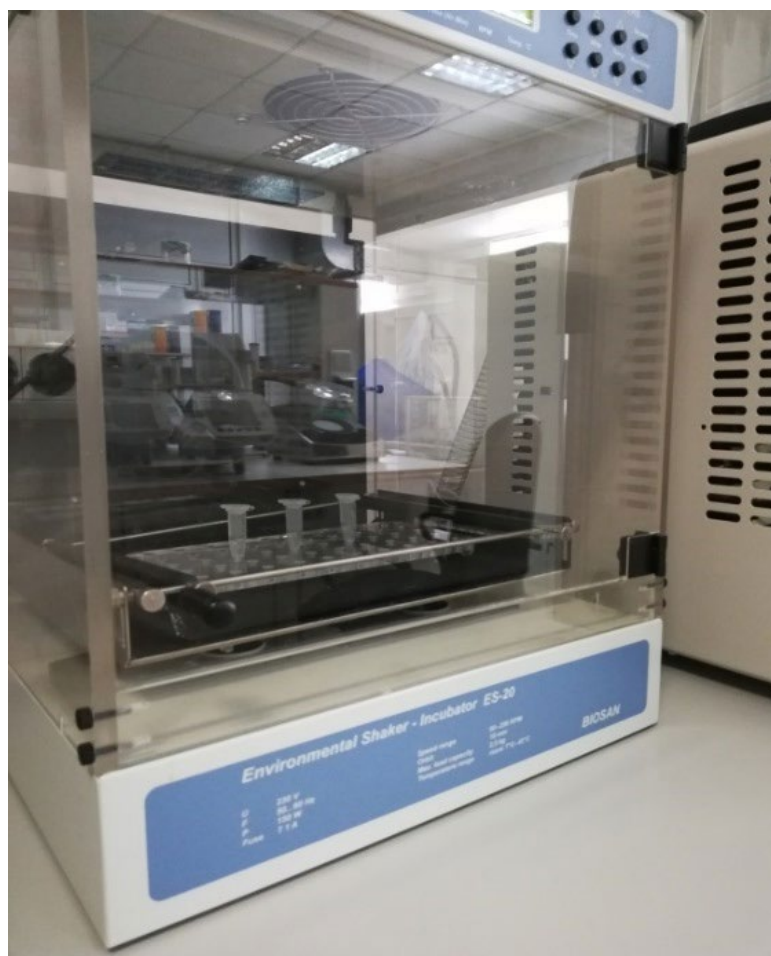


Рис. 5. Инкубация фагоцитирующих смесей

2.4. Приготовление мазков

Образцы после инкубации использовали для приготовления мазков (рис. 6). Для этого небольшую каплю крови (10 мкл) помещали на предметное стекло, затем, отступая от одного края стекла на 1 см, под углом в 45° шлифованным стеклом делали равномерный мазок, не доходя до другого края на 2 см. После приготовления мазки быстро высушивали на воздухе до исчезновения влажного блеска.

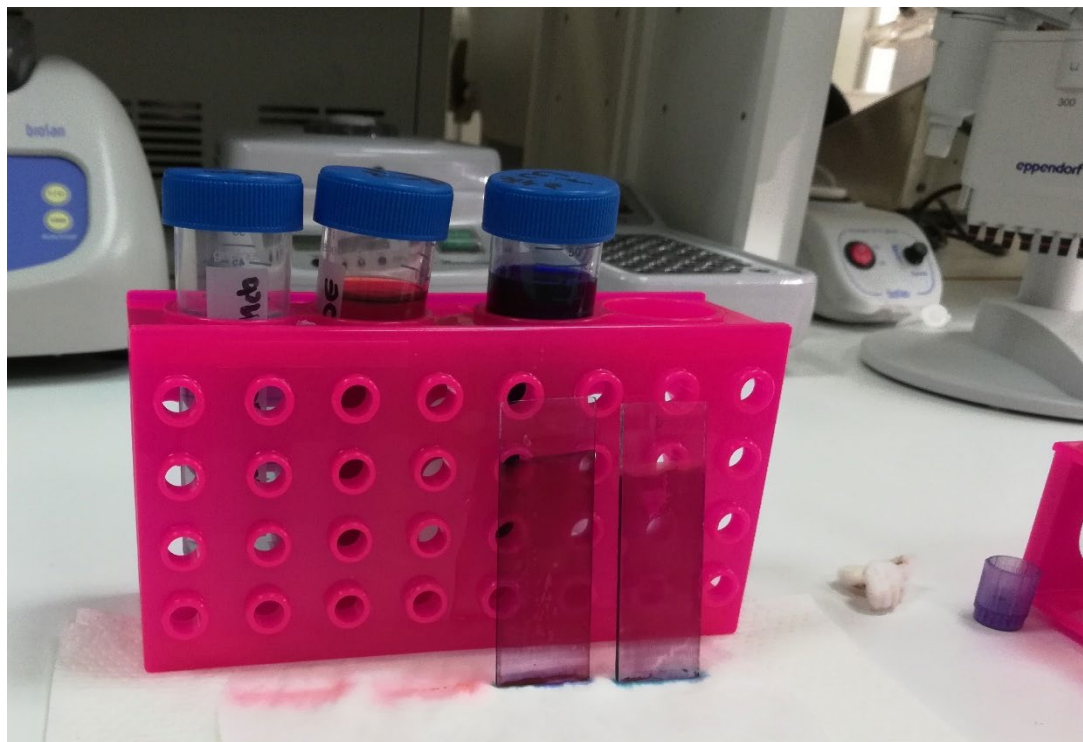


Рис.6. Окрашенные мазки фагоцитирующих смесей

Фиксация и окрашивание мазков осуществлялись растворами «Диахим-Дифф-Квик». Фиксация препарата проводили в растворе, содержащем метанол, в течение 1 минуты. Окрашивание эозином проводили в течение 30-45 секунд, окрашивание гематоксилином – в течение 1,5 минут.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Так как подсчет числа фагоцитирующих клеток возможно проводить только в фиксированных мазках, то на начальном этапе работ необходимо было проверить, сохраняется ли способность бактерий к флуоресценции после фиксации. Для этого фиксированный и окрашенный мазок клеток *E. coli* BL21(DE3), содержащих зеленый флуоресцентный белок, микрофотографировали в двух параллельных режимах: в проходящем свете (рис. 7) и в режиме флуоресценции с использованием светофильтра FITC (рис. 8).

На данных рисунках представлено одно и то же поле зрения в каждом из перечисленных режимов. Таким образом, удалось показать, что 100% бактериальных клеток продолжают флуоресцировать даже после фиксации препарата.

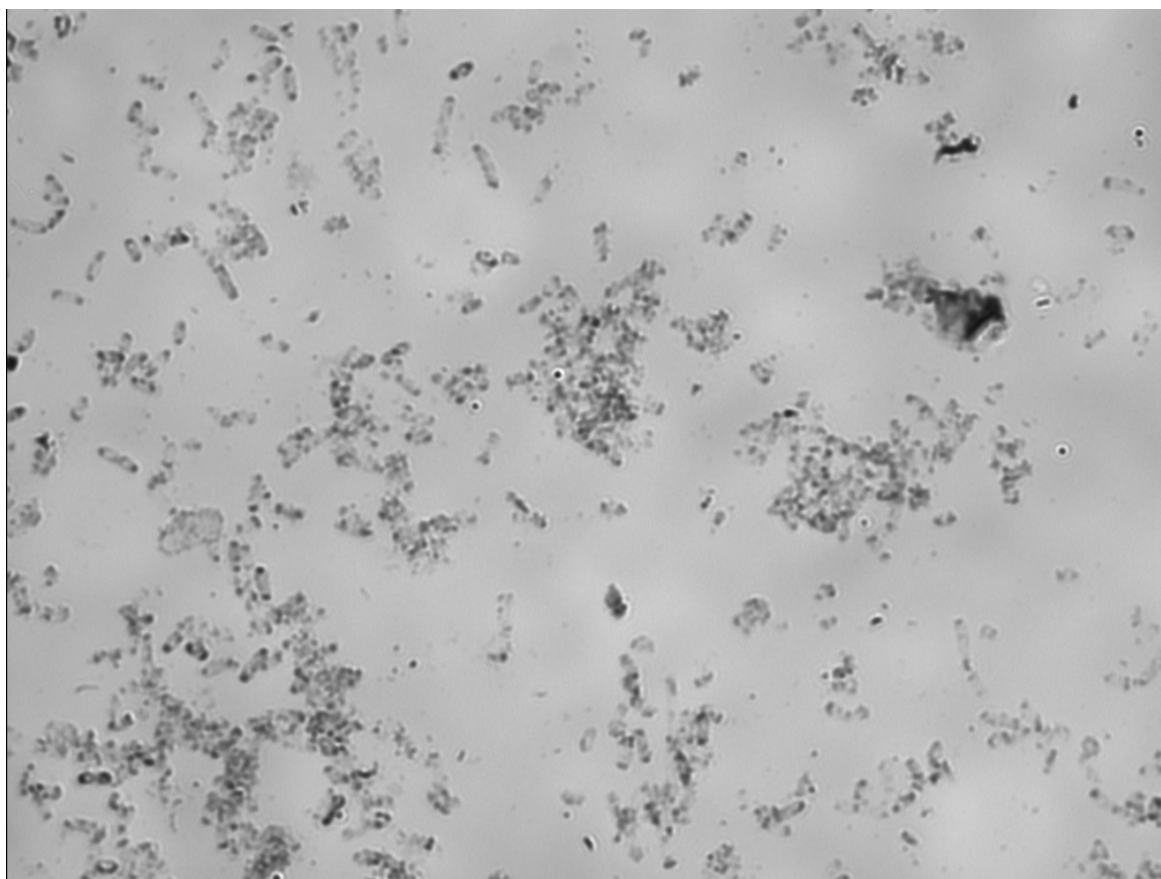


Рис. 7. Микрофотография фиксированного мазка *E. coli* BL21(DE3)/pRQSTEP-GFP в проходящем свете

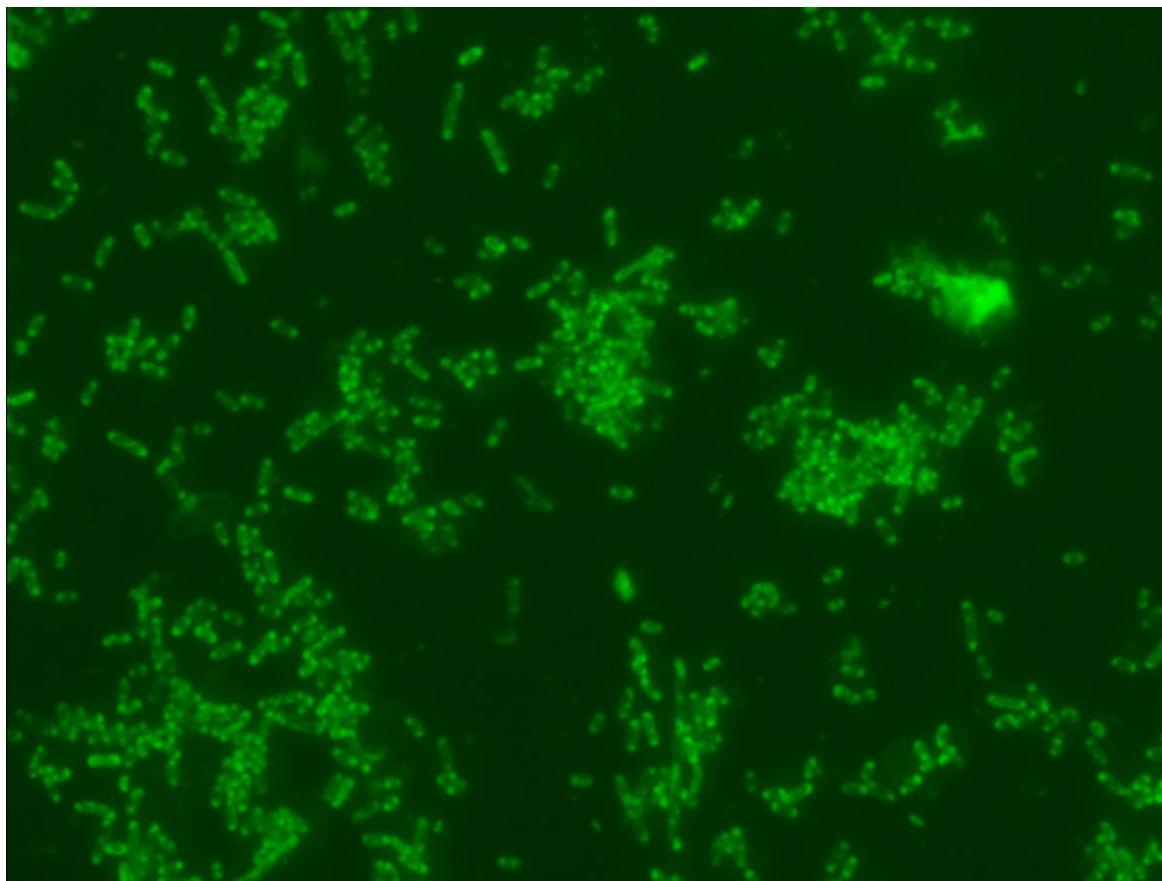


Рис. 8. Микрофотография фиксированного мазка *E. coli* BL21(DE3)/pRQSTEP-GFP в режиме флуоресценции

Аналогичный эксперимент был проведен с экспериментальным образцом крови после добавления бактериальной культуры и дальнейшей инкубации. В фиксированных мазках наблюдали флуоресцентные фагоцитирующие клетки (рис. 9). Примечательно, что после разрушения мембраны бактерии зеленый флуоресцентный белок не локализуется в определенной области, а практически равномерно распределяется по объему фагоцита. Этот эффект в дальнейшем позволит исключить ложноположительные результаты, которые неизбежно получают при использовании классического (нефлуоресцентного) метода, вследствие наложения бактерий и фагоцитов друг на друга.

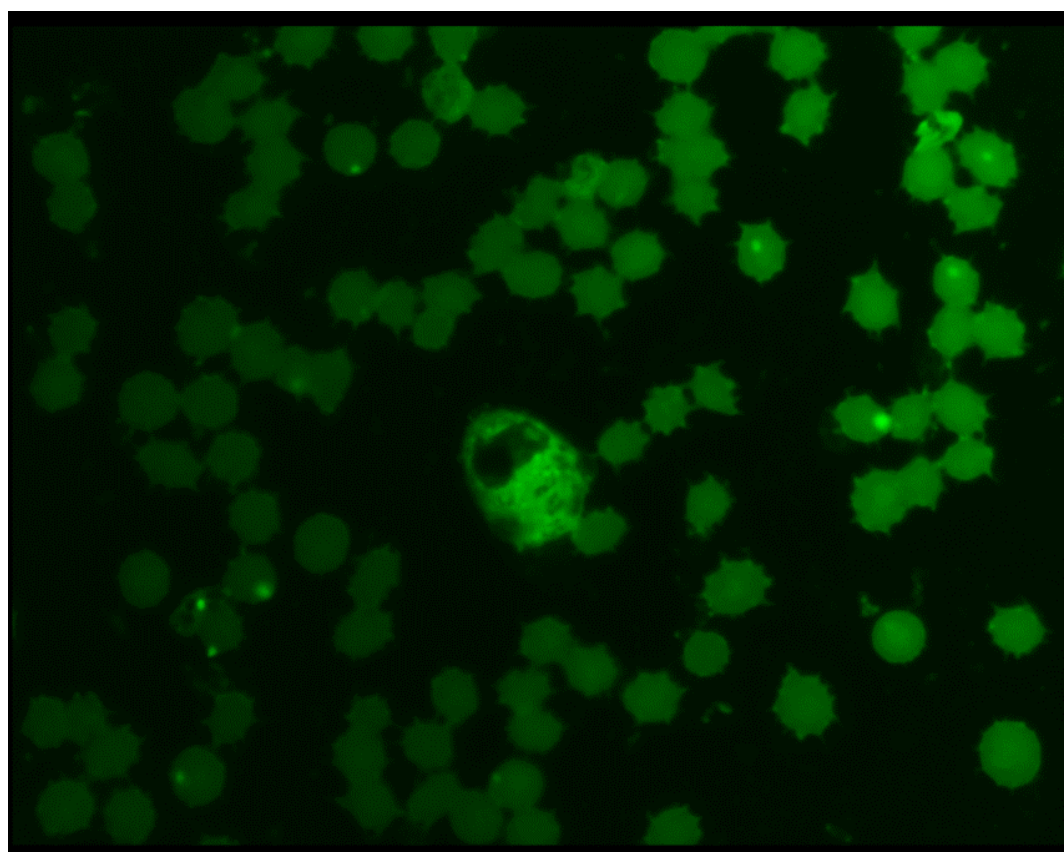
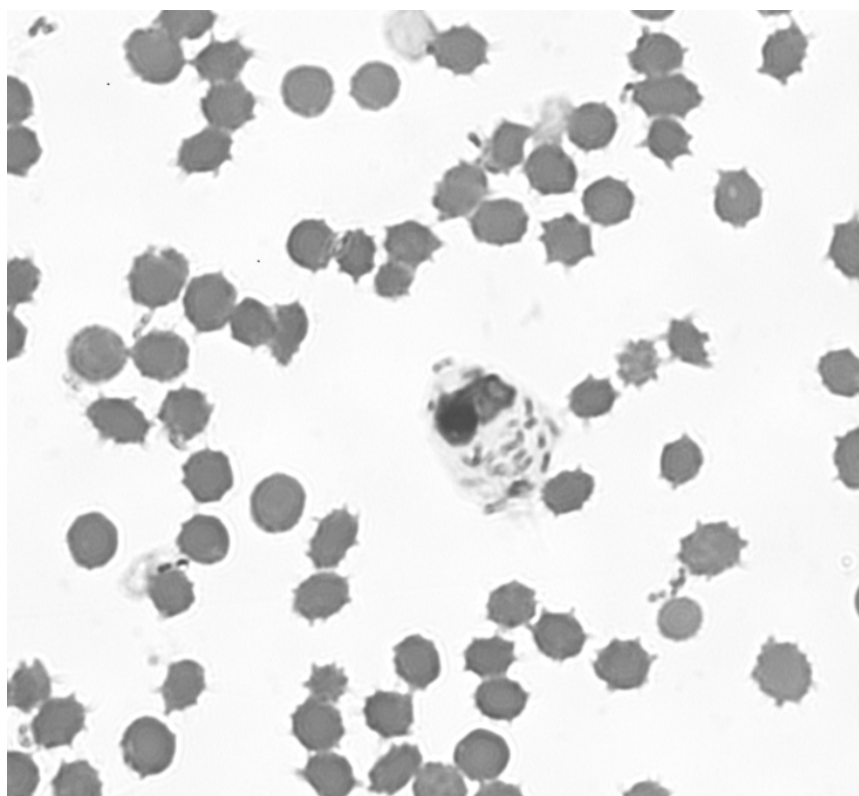


Рис. 9. Флуоресцирующий нейтрофил, поглотивший бактерию с зеленым флуоресцентным белком.

Примечание: сверху – микрофотография в проходящем свете, снизу – микрофотография в режиме флуоресценции

Для определения оптимального соотношения количества бактерий и объема анализируемого образца крови был поставлен следующий опыт. В 6 пробирок с различным количеством цельной крови добавляли различный объем ночной культуры флуоресцентного штамма. Образцы инкубировали в течение часа минут при 37°C, а затем использовали для приготовления мазков. При микроскопировании мазков проводили подсчета фагоцитарного числа (ФЧ) – среднего количества микроорганизмов, поглощенных одним «истинным» фагоцитом. В каждом варианте опыта было просмотрено по 100-120 клеток (табл. 1).

Таблица 1

Значение фагоцитарного числа при различном соотношении количества бактерий и объема анализируемого образца крови

№ опыта	Объемное соотношение ночной культуры бактерий и цельной крови					
	1:9	1:4	1:2	1:1	2:1	3:1
	Среднее значение микроорганизмов, поглощенных одним фагоцитом					
1	1	1	2	4	5	3
2	0	1	1	3	4	5
3	2	2	2	4	3	5
4	1	1	3	4	4	4
5	1	2	1	5	4	5
6	0	3	2	4	3	3
7	1	1	1	4	4	4
8	0	2	2	3	3	4
9	1	1	3	4	4	4
10	2	0	1	4	3	4
11	1	1	2	5	3	5
12	1	2	1	3	4	3
13	1	1	2	4	3	4
14	1	2	3	5	5	3
15	1	1	2	4	4	4
16	2	2	1	5	5	3
17	0	3	2	4	4	4
18	1	1	2	3	4	3
19	0	1	2	4	5	4
20	2	3	3	3	5	3
21	0	0	1	5	4	5

22	2	1	2	4	4	5
23	1	3	1	6	3	3
24	1	2	2	3	3	4
25	0	3	3	4	4	4
26	1	1	2	4	3	3
27	1	2	3	5	5	4
28	1	1	3	3	3	5
29	0	1	3	4	4	2
30	0	0	2	5	3	3

Статистически обработанные данные представлены в таблице 2. Зависимость фагоцитарного числа от соотношения объемов ночной культуры бактерий и цельной крови отражена на рисунке 9.

Таблица 2

Средние значения фагоцитарного числа при различном соотношении количества бактерий и объема анализируемого образца крови

№ опытного варианта	Объем культуры бактерий, мкл	Объем образца крови, мкл	Объемное соотношение	Фагоцитарное число, $\bar{x} \pm x_m$
1	12	108	1:9	0,70 ± 0,09
2	24	96	1:4	1,34 ± 0,11
3	40	80	1:2	2,28 ± 0,11
4	60	60	1:1	4,18 ± 0,11
5	80	40	2:1	4,04 ± 0,10
6	90	30	3:1	4,04 ± 0,11

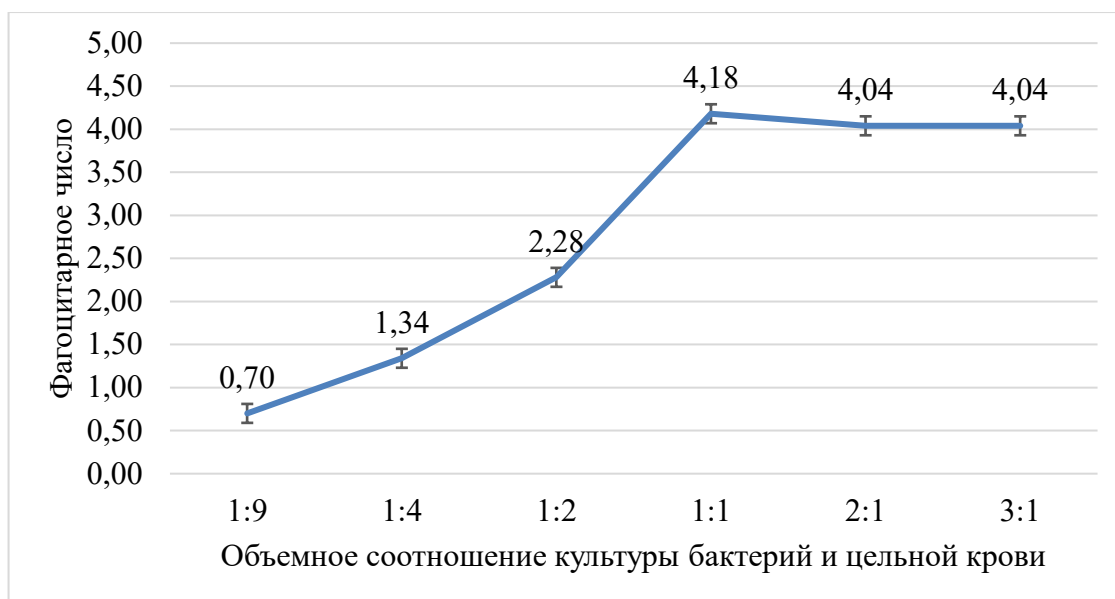


Рис. 10. Зависимость фагоцитарного числа от объемного соотношения ночной культуры бактерий и цельной крови

Полученные результаты показывают, что максимальное значение фагоцитарного числа наблюдается при соотношении объемов культуры бактерий и цельной крови 1:1. Дальнейшее увеличение количества бактерий в смеси не влияет на интенсивность фагоцитоза. Из этого можно сделать вывод о том, что фагоцитоз проходит менее интенсивно при недостатке поглощаемых микроорганизмов, когда как избыток культуры не оказывает значительного воздействия на процесс фагоцитоза.

Для получения в дальнейшем с использованием разрабатываемого способа наиболее точных и воспроизводимых результатов определения фагоцитарной активности необходимо было оптимизировать продолжительность инкубации экспериментальных образцов, как один из наиболее ключевых параметров всей методики. Эксперимент проводили в 30 повторностях. К 60 мкл цельной крови добавляли по 60 мкл ночной культуры флуоресцентного штамма и инкубировали при температуре 37°C в течение одного или двух часов. Образцы после инкубации использовали для приготовления мазков с последующим микроскопированием и определением фагоцитарной активности. Результаты эксперимента представлены ниже (табл. 3).

Таблица 3

Значения фагоцитарного индекса при различном времени инкубации
экспериментальных образцов, %*

№ пробы	Число просмотренных клеток, шт.	Время инкубации	
		1 час	2 часа
1	400	42,06 ± 2,47	57,55 ± 2,47**
2	320	36,82 ± 2,70	60,83 ± 2,73**
3	330	38,56 ± 2,70	58,99 ± 2,71**
4	340	40,07 ± 2,66	61,28 ± 2,64**
5	320	37,77 ± 2,71	61,70 ± 2,72**
6	360	42,95 ± 2,61	63,83 ± 2,53**
7	320	36,35 ± 2,69	65,31 ± 2,66**
8	310	38,75 ± 2,77	59,22 ± 2,79**
9	300	39,20 ± 2,82	60,03 ± 2,83**
10	350	41,48 ± 2,63	62,40 ± 2,59**
11	370	39,44 ± 2,54	55,86 ± 2,58**
12	330	35,89 ± 2,64	60,49 ± 2,69**
13	340	40,18 ± 2,66	59,80 ± 2,66**
14	390	37,77 ± 2,45	58,34 ± 2,50**
15	350	38,11 ± 2,60	61,55 ± 2,60**
16	400	42,14 ± 2,47	60,52 ± 2,44**
17	310	38,33 ± 2,76	61,84 ± 2,76**
18	340	40,08 ± 2,66	59,37 ± 2,66**
19	340	39,88 ± 2,66	56,10 ± 2,69**
20	300	37,18 ± 2,79	58,22 ± 2,85**
21	320	42,28 ± 2,76	69,47 ± 2,57**
22	360	43,16 ± 2,61	64,01 ± 2,53**
23	330	39,67 ± 2,69	57,97 ± 2,73**
24	380	44,07 ± 2,55	56,85 ± 2,54**
25	350	38,34 ± 2,60	60,77 ± 2,61**
26	370	34,19 ± 2,47	64,29 ± 2,49**
27	300	41,86 ± 2,85	59,21 ± 2,84**
28	400	37,95 ± 2,43	54,74 ± 2,49**
29	380	38,72 ± 2,50	59,93 ± 2,51**
30	350	39,67 ± 2,61	63,10 ± 2,58**

Примечание: * – за результат в пробе принимают среднее арифметическое значение результатов трёх параллельных определений (мазков); ** – различия достоверны при $p \leq 0,001$.

Таким образом, после двухчасовой инкубации во всех образцах отмечали достоверное увеличение фагоцитарного индекса. По данным Горчакова А.М. с соавторами наиболее полными и достаточными результатами для отражения реальной картины фагоцитоза стоит считать значения в пределах 60-80% [Горчаков, Кручинский, Горчакова, с. 9], которым наиболее соответствуют результаты, полученные в ходе двухчасовой инкубации.

Для объективности результатов при измерении фагоцитарной активности большое значение имеет истинность фагоцитоза. Под истинностью фагоцитоза в данном случае стоит понимать именно поглощение фагоцитом инородных частиц, тогда как существует и ложный. В поле зрения микроскопа во время подсчёта активных фагоцитов может вполне попасть клетка, не поглотившая микроорганизм, а лежащая с ним в разных фокальных плоскостях – под ним или над ним. Без учета истинности фагоцитоза создаются определённые трудности при подсчёте фагоцитов без использования флуоресценции, которые в свою очередь искажают результаты опыта и интерпретацию. При использовании же флуоресцентного метода истинный фагоцитоз достаточно легко отличить от ложного. Для проверки этой гипотезы мы сравнили результаты определения фагоцитарной активности при использовании разрабатываемого нами метода и классического (нефлуоресцентного) метода (табл. 4).

Таблица 4

Значения фагоцитарного индекса при сравнении двух методов, %*

№ пробы	Число просмотренных клеток, шт.	Метод определения фагоцитарной активности	
		Классический	Флуоресцентный
1	340	83,30 ± 2,02	63,22 ± 2,62**
2	390	76,54 ± 2,15	64,90 ± 2,42**
3	400	78,73 ± 2,05	63,85 ± 2,40**
4	350	76,29 ± 2,27	71,18 ± 2,42**
5	310	81,33 ± 2,21	69,25 ± 2,62**
6	360	75,34 ± 2,27	70,15 ± 2,41**
7	320	84,11 ± 2,04	64,65 ± 2,67**

8	320	83,20 ± 2,09	65,21 ± 2,66**
9	370	74,78 ± 2,26	60,50 ± 2,54**
10	350	77,62 ± 2,23	62,29 ± 2,59**
11	330	80,29 ± 2,19	64,87 ± 2,63**
12	400	74,93 ± 2,17	70,28 ± 2,29**
13	360	82,42 ± 2,01	66,30 ± 2,49**
14	390	79,11 ± 2,06	69,11 ± 2,34**
15	320	78,16 ± 2,31	64,71 ± 2,67**
16	340	79,83 ± 2,18	68,25 ± 2,52**
17	330	81,49 ± 2,14	69,34 ± 2,54**
18	300	80,44 ± 2,29	71,10 ± 2,62**
19	360	75,90 ± 2,25	70,59 ± 2,40**
20	380	74,69 ± 2,23	64,54 ± 2,45**
21	320	80,27 ± 2,22	67,55 ± 2,62**
22	370	81,79 ± 2,01	67,99 ± 2,43**
23	300	80,88 ± 2,37	64,18 ± 2,64**
24	300	78,65 ± 2,19	70,22 ± 2,29**
25	390	76,41 ± 2,15	69,83 ± 2,32**
26	340	81,67 ± 2,10	72,37 ± 2,43**
27	400	83,43 ± 1,86	67,24 ± 2,35**
28	350	80,29 ± 2,13	61,50 ± 2,60**
29	380	79,35 ± 2,08	66,32 ± 2,42**
30	340	82,98 ± 2,04	63,20 ± 2,62**

Примечание: * – за результат в пробе принимают среднее арифметическое значение результатов трёх параллельных определений (мазков); ** – различия достоверны при $p \leq 0,001$.

Полученные результаты свидетельствуют о достоверных различиях в фагоцитарной активности, определенной разными способами в одних и тех же мазках. На наш взгляд, это можно объяснить только тем, что традиционный метод, в отличие от флуоресцентного, не имеет возможности наглядной проверки истинности фагоцитоза. Это зачастую может исказить результат анализа в большую сторону. Полученный нами результат позволяет рассчитывать на более точное определение фагоцитарного индекса в случае использования флуоресцирующих бактерий. Кроме того, мы надеемся, что в дальнейшем разработанный нами подход позволит полностью отказаться от ручного подсчета клеток и автоматизировать анализ благодаря использованию флуориметра и проточного цитофлуориметра.

ВЫВОДЫ

1. Разработан метод оценки фагоцитарной активности нейтрофилов с применением бактерий *E. coli* BL21(DE3), содержащих зеленый флуоресцентный белок.
2. Предварительная фиксация препаратов не препятствует сохранению флуоресцентных свойств, как бактериальных, так и фагоцитирующих клеток.
3. Оптимальным объемным соотношением культуры бактерий и цельной крови при проведении анализа является 1:1; добавление избытка бактерий не влияет на фагоцитарную активность.
4. Продление времени инкубации экспериментальных образцов на 1 час приводит к достоверному увеличению фагоцитарного индекса примерно в 1,5 раза.
5. Значения фагоцитарного индекса, определенные с помощью традиционного (нефлуоресцентного) метода, достоверно выше аналогичных показателей, полученных с использованием разработанного метода.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. A. Manfredi, G. A. Ramirez, P. Rovere-Querini [et al.]. The Neutrophil's Choice: Phagocytose vs Make Neutrophil Extracellular Traps. // *Front. Immunol.* 20 February 2018. URL: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00288>
2. Biochemical and physical properties of green fluorescent protein: *Methods Biochem Anal.* / W.W. Ward. 2006. V.6. № 8. P. 39-65.
3. Chediak-Higashi syndrome: Current Opinion in Hematology / J. Kaplan, I. De Domenico, D. M. Ward. 2008. V.15, pp. 22–29.
4. Chemical nature of bioluminescence systems in coelenterates: *Proc Natl Acad Sci USA* / O. Shimomura, F. H. Johnson. 1975. V. 72. №4. P. 1546–1549
5. Chemical nature of the light emitter of the *Aequorea* green fluorescent protein: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* / H. Niwa, [et al.]. 1996. V.35. P. 136-137.
6. Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green-fluorescent protein: *Biochemistry* / C.W. Cody [et al.]. 1993. V.23. P. 121-123.
7. Energy transfer in a bioluminescent system: *Journal of Cellular Physiology* / J. G. Morin, J.W. Hastings. 1971. V.77. № 3. P. 313-318.
8. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*: *Journal of Cellular and Comparative Physiology* / O. Shimomura, F. H. Johnson, Y. Saiga. 1962. V. 59. I. 3. P. 223-239
9. Flow cytometric assay for quantifying opsonophagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus* by peripheral blood leukocytes: *Journal of Clinical Microbiology* / E. Martin, S. Bhakdi. 1992. V.30. № 9. P. 2246-2255.
10. Fluorescent pigments in corals are photoprotective: *Nature* / A. Salih, [et al.]. 2000. V.408. P. 850-853.

11. GFP: Lighting up life: Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA / Chalfie M. 2009. V.106. № 25. P. 356-387.
12. Green fluorescent proteins are light-induced electron donors: Nature Chemical Biology / A.M. Bogdanov [et al.]. 2009. V.5. P. 459-461.
13. Green fluorescent protein as a marker for gene expression: Science / M. Chalfie, G. Euskirchen, W.W. Ward [et al.]. 1994. V. 263. I. 5148. P. 802-805
14. Immunological analysis of sputum and blood plasma in CF: Science / T.P. Stossel. 2000. V.287. I. 5457. P. 1375-1377.
15. IPOPI — International Patient Organisation for Primary Immunodeficiencies: официальный сайт. Корнуолл 1992. URL: <https://ipopi.org/> (дата обращения 12.12.2019)
16. Kinetics of staphylococcal opsonization, attachment, ingestion and killing by human polymorphonuclear leukocytes: a quantitative assay using [3H]thymidine labeled bacteria: J. Immunol. Methods / J. Verhoeve, P.K. Peterson. 1977. V.14. № 4. P. 303-311.
17. Luminol-enhanced chemiluminescence induced in peripheral blood-derived human phagocytes: obligatory requirement of myeloperoxidase exocytosis by monocytes: Journal of Leucocyte Biology / D. Albrecht, T.W. Jungi. 1993. V. 54. P. 300-306.
18. Neutrophil extracellular traps kill bacteria: Science / V. Brinkmann. 2004. V.303. P. 1532-1535.
19. Neutrophils in cancer: prognostic role and therapeutic strategies: Molecular Cancer / A. Ocana, C. Nieto-Jiménez, A. Pandiella [et al.]. 2017. V.16. P. 132-137.
20. Opsonic requirements for staphylococcal phagocytosis. Heterogeneity among strains: Immunology / J. Verhoeve [et al.]. 1977. V.33. № 2. P. 191-197.
21. Purification and properties of *Cypridina* luciferase: Journal of Cellular and Comparative Physiology / O. Shimomura, F. H. Johnson, Y. Saiga. 1961. V. 58. I. 2. P. 113-123

22. Quantum efficiency of Cypridina luminescence, with a note on that of Aequorea: *Journal of Cellular Physiology* / F.H. Johnson [et al.]. 1962. V.60. № 1. P.85–103.
23. Structural basis of spectral shifts in the yellow-emission variants of green fluorescent protein: *Structure* / R.M. Wachter. 1998. Vol. 6. № 10. P. 1267-1277.
24. Structure of the chromophore of Aequorea green fluorescent protein: *FEBS Letters* / O. Shimomura. 1979. V.18. № 3. P. 220-222.
25. The green fluorescent protein: *Biochemistry* / R.Y. Tsien. 1998. V.67. № 5. P. 148-175.
26. Unified nexus of macrophages and maresins in cardiac reparative mechanisms: *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology* / J. K. Jadapalli, G. V. Halade. 2018. V. 32. № 10. P. 5227-5237.
27. А.И. Клыков, Т.Т. Дудуня, А.В. Новикова. Ген GFP и «мозговая радуга» // *Бюллетень медицинских Интернет-конференций*. 2011. Т. 1. № 1. С. 43-45. URL: <http://medconfer.com/files/archive/Bulletin-of-MIC-2011-01.pdf>
28. Академия естествознания: международная ассоциация учёных, преподавателей, специалистов [<https://www.rae.ru/ru/>]. Москва. 2006. URL: <https://www.rae.ru/ru/publishing/mono07.html>.
29. Барыкина Н. В. Разработка новых генетически кодируемых флуоресцентных кальциевых индикаторов для визуализации активности нейронов: специальность 02.00.10 Биоорганическая химия: диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук. Москва, 2018. 177 с.
30. Божанова Н. Г. Разработка и изучение флуоресцентных меток методами моделирования и молекулярной эволюции белков: специальность 03.01.03 Молекулярная биология: диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Москва, 2017. 138 с.
31. Варианты трансформации фенотипа нейтрофильных гранулоцитов CD64+CD32+CD11b+ у новорожденных с различными

инфекционно-воспалительными заболеваниями: Цитокины и воспаление / И.В. Нестерова, Н.В. Колесникова. 2011. № 4. С. 8-9.

32. Влияние хромофора на спектральные свойства GFP-подобных белков: Современные проблемы науки и образования / А.А. Пахомов. 2012. № 5. URL: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=7318>

33. Горчаков А.М., Кручинский Н.Г., Горчакова Ф.Т. [и др.] Метод комплексной оценки фагоцитарной активности нейтрофилов в крови // НИИ экологической и профессиональной патологии. Могилев, 2003. С. 8-9.

34. Исаков, В.А., Исаков Д.В., Архипова Е.И. Герпесвирусные инфекции человека. Санкт-Петербург: Спец.Лит, 2013. – 670 с.

35. Исследование структурно-функционального состояния нейтрофилов крови человека в условиях воздействия А2В интерферона: Вестник ВГУ / И. А. Колтаков [и др.]. 2015. № 3. С. 24-25.

36. Липунова, Е.А. Физиология крови: моногр. исслед. / Е.А. Липунова, М.Ю. Скоркина. – Белгород: Изд-во БелГУ, 2007. – 324 с.

37. Мечников, И.И. Иммунология. Избранные работы. Москва: Юрайт, 2017. 368 с.

38. Новые аспекты оценки фагоцитарной активности клеток крови при туберкулезе легких: Инфекция и иммунитет / С.Н. Скорняков, И.Д. Медвинский, О.В. Бердюгина [и др.]. 2012. Т. 2. № 4. с. 723–728

39. Особенности системного и местного фагоцитоза при инфекционно-воспалительных заболеваниях влагалища: Здоровье женщины / Ю.П. Вдовиченко, Г.А. Барановская. 2013. №2. С. 132-134.

40. Оценка внутриклеточного киллинга фагоцитами периферической крови с помощью проточной цитометрии: Иммунология / Д.В. Мазуров, С. В. Дамбаева, Б.В. Пинегин. 2000. №2. С. 5-12.

41. Оценка фагоцитарной и бактерицидной активности нейтрофилов, макрофагов и незрелых дендритных клеток: Иммунология / Н.С. Олиферук, А.Н. Ильинская, Б.В. Пинегин. 2005. № 1. с. 10-12.

42. Оценка фагоцитарных и бактерицидных свойств моноцитов периферической крови потомства животных с патологией гепатобилиарной системы различной этиологии: Вестник ЮУрГУ / Г.В. Брюхин, Е.Ю. Шаврина. 2011. №39. С. 85-89.

43. Патент № 2366953 Российская Федерация. Биохемилюминесцентный способ определения фагоцитарной активности нейтрофилов: № 2007139351/15: заявл. 23.10.2007 / Д.Г. Дерябин, И.Ф. Каримов; заявитель ГОУ ВПО Оренбургский государственный университет. 16 с.

44. Показатели фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови у больных с развившейся нестабильностью эндопротеза в отдаленные сроки после имплантации крупных суставов: Гений ортопедии / Е. И. Кузнецова, М. В. Чепелева, Б. В. Камшилов. 2011. №4. С. 82-84.

45. Получение штамма *Yersinia pestis*, продуцирующего флуоресцентный белок GFP, и перспективы его использования: Проблемы особо опасных инфекций / Л.М. Куклева, И.В. Тучков, Е.Г. Оглодин [и др.]. 2019. № 4. С.61-66.

46. Причины, определяющие характер изменения бактериальной люминесценции при воздействии сыворотки крови: Микробиология / Д.Г. Дерябин, Е.Г. Поляков. 2005. № 2. с. 191-197.

47. Роль адгезии в активации нейтрофилов и цитотоксическом взаимодействии нейтрофилов с эндотелием: Успехи современной биологии / А.А. Галкин, В.С. Демидова. 2011. т. 131. № 1. с. 62–78

48. Рудик, Д.В., Тихомирова Е.И. Методы изучения процесса фагоцитоза и функционально-метаболического состояния фагоцитирующих клеток. Саратов: СГУ, 2006. – 112 с.

49. Сделать животных светящимися: Химия и жизнь / М. Левицкий. 2009. № 9. С. 28-32.

50. Сегментация ядер нейтрофилов: новый взгляд на природу явления: Клиническая лабораторная диагностика / Ю.А. Антонишкис. 2006. № 8. С. 22-25.
51. Современные подходы к оценке основных этапов фагоцитарного процесса Иммунология / Р.М. Хаитов, Б.В. Пинегин. 1995. № 3. С. 3-8.
52. Соколова Е. А. Флуоресцирующая модель НЕК2-гиперэкспрессирующей опухоли яичника человека и ее использование для оценки эффективности таргетного иммунотоксина на основе экзотоксина А: специальность 03.01.02 Биофизика: диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Москва, 2016. 117 с.
53. Способы мечения клеток для визуализации *in vivo*: Клеточная трансплантология и тканевая инженерия / А.О. Соловьева, К.Э. Зубарева, А.Ф. Повещенко [и др.]. 2013. Т. 8. № 4. с.33-38
54. Способ определения фагоцитарной активности лейкоцитов по степени гашения биоломинесценции: Иммунология / С.В. Ширшев [и др.]. 2014. № 6. С. 312-316.
55. Степаненко О.В. Процессы сворачивания-разворачивания и стабильность белков, имеющих структуру типа бета-бочонка: специальность 03.00.03 Молекулярная биология: диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Санкт-Петербург, 2008. – 130 с.
56. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза: от 6 июня 2014: по состоянию на 15.12.2019. Москва. Стандартинформ, 2019. 19 с.
57. Флуоресцентные белки: физико-химические свойства и использование в клеточной биологии: Цитология / О. В. Степаненко, И.М. Кузнецова, К.К. Туроверов [и др.]. 2007. Т.49. № 5. С. 395-420.
58. Фримель Г. Иммунологические методы. Москва: Мир, 1979. 384 с.
59. Хаитов Р.М., Игнатьева Г.А. Иммунология. Москва: Медицина, 2000. 432 с.

60. Хаитов, Р.М, Пинегин Б.В., Ярилин А.А. Руководство по клинической иммунологии. Диагностика заболеваний иммунной системы. Москва: ГОЭТАР-МЕДИА, 2009. – 352 с.

61. Хроническая гранулематозная болезнь. Диагностика и ведение пациента на современном этапе: Фундаментальная наука в современной медицине – 2018: сборник материалов сателлитной дистанционной научно-практической конференции студентов и молодых ученых / БГМУ: Д. А. Веремей, О. С. Лупальцова. Минск: под ред. А. В. Сикорского, О. К. Дорониной, Т. В. Горлачёвой, Ф. И. Висмонта, 2018. с. 368-372.

62. Шемякина И.И. Красные и дальне-красные флуоресцентные белки, оптимизированные для мечения белков слияния: специальность 03.01.03 Молекулярная биология: диссертация на соискание кандидата биологических наук. Москва, 2015. – 101 с.

63. Экспресс-метод скрининга трансгенных растений картофеля по интенсивности флуоресценции репортерного белка GFP / Н.О. Юрьева, А.С. Воронков, Д.В. Терешонок, [и др.] // Вестник Московского Университета. 2018. Серия. 16. Т. 73. № 2. С. 85–92.

64. Ямпольский И.В. Синтез хромофоров белков семейства зелёного флуоресцентного белка: специальность 03.00.04 Биохимия: диссертация на соискание кандидата химических наук. Москва, 2009. – 109 с.

65. Ярилин А.А. Иммунология. Москва: ГЭОТАР-МЕДИА, 2010. 752 с.