

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой



Е.И. Шишацкая

подпись

« 23 »

июня 2017 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

Особенности метаболических механизмов пролиферативной активности
лимфоцитов у больных перитонитом

Руководитель



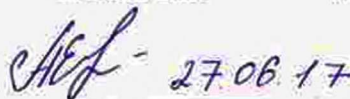
подпись, дата

профессор, д.м.н.

должность, ученая степень

А.А. Савченко

Выпускник



подпись, дата

А.Е. Татаркина

СОДЕРЖАНИЕ

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	3
1.1 Лимфоциты: свойства и функции.....	3
1.1.1 Т-лимфоциты. Механизмы развития клеточного иммунитета	7
1.1.2 В-лимфоциты. Механизмы развития гуморального иммунитета.....	10
1.2 Реакция бласттрансформации лимфоцитов как проявление их функциональной активности	12
1.3 Метаболизм клеток иммунной системы.....	13
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	15
2.1 Пациенты	15
2.2 Реакция бласттрансформации лимфоцитов и методика постановки	15
2.3 Биоломинесцентный анализ.....	18
2.4 Проточная цитометрия	22
2.5 Статистические методы исследований	26
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	27
3.1 Оценка активности внутриклеточных ферментов лимфоцитов в динамике реакции бласттрансформации.....	Ошибка! Закладка не определена.
3.2 Оценка клеточного цикла лимфоцитов	Ошибка! Закладка не определена.
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	Ошибка! Закладка не определена.
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	28
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	29

ВВЕДЕНИЕ

Иммунная система в связи с ее функциональными задачами является главной в защите организма от внешних и внутренних патогенных факторов, принимает участие во всех регуляторных процессах в организме. Клетки иммунной системы, которые выполняют ключевые функции по осуществлению клеточного и гуморального иммунитета, являются лимфоциты.

Лимфоциты являются главными иммунными клетками, так как роль лимфоцитов в адекватном иммунном ответе наиболее значимая. Столь высокая значимость лимфоцитов обусловлена механизмом иммунного ответа на попадание в организм инфекции и чужеродных веществ. Именно они первые реагируют на инфекцию, распознают чужеродные антигены и запускают целые цепочки иммунных реакций, в результате которых вырабатываются антитела и происходит активация фагоцитоза. Лимфоциты способны специфически распознавать собственные и чужеродные антигены и отвечать активацией на контакт с конкретным антигеном. Это единственные клетки в организме, чье развитие не завершается без вмешательства внешних факторов, в роли таких факторов выступают антигены. Реакция лимфоцитов на антигенные стимулы составляет основу адаптивного иммунного ответа.

Целью моей работы является исследование изменений метаболических параметров клеток иммунной системы в динамике реакции бласттрансформации лимфоцитов.

На основании поставленной цели были определены следующие задачи:

1. Оптимизировать методику постановки реакции бласттрансформации для оценки метаболических параметров клеток иммунной системы;
2. Измерить уровень ДНК клеток иммунной системы в динамике реакции бласттрансформации;
3. Измерить уровни активности внутриклеточных ферментов лимфоцитов в динамике реакции бласттрансформации

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Лимфоциты: свойства и функции

Лимфоциты - это популяция иммунокомпетентных клеток, определяющая высокую специфичность ответа иммунной системы на чужеродное. Содержание их в среднем составляет $1-4 \times 10^9$ клеток в 1 л крови. Имеются два основных типа лимфоцитов, обладающих различным гистогенезом и конечной эффекторной функцией: Т- лимфоциты, обеспечивающие клеточный иммунитет, и В-лимфоциты, ответственные за антителообразование. Принципиально отличается от них особый тип лимфоцитов - естественные (нормальные) киллеры [1,5].

Лимфоциты, циркулирующие с кровью, являются в основном зрелыми клетками, дифференцированными на субпопуляции: Т-хелперы (помощники), Т-супрессоры, В-лимфоциты (предшественники плазматических клеток) и др. Они могут выполнять целый ряд эффекторных функций. Однако наиболее важно то, что в ответ на антигенное раздражение лимфоциты могут, оседая в лимфоидной ткани, активно размножаться и дифференцироваться в конечные эффекторные клетки (в плазматические клетки из В-лимфоцитов и цитотоксические - из Т-лимфоцитов). Количество таких образованных специфически реагирующих на антиген клеток на несколько порядков превышает число первоначально имевшихся клеток специфического к данному антигену клона, имевшихся в организме до его поступления, что определяет мощный специфический ответ иммунной системы организма. Все конечные клетки-эффекторы имеют короткий жизненный цикл [5,28].

Морфологически лимфоциты периферической крови в основном однотипны. По размеру их подразделяют на малые, средние и большие. В процессе деления и дифференцировки в ответ на антигенный стимул лимфоцит морфологически проходит стадии лимфобласта, большого, среднего и малого лимфоцита. В периферической крови встречаются обычно малые и редко -

средние лимфоциты (их количество при септическом процессе возрастает). Малые лимфоциты - это округлые клетки диаметром 5-8 мкм с высоким ядерно- цитоплазматическим отношением. Они имеют круглое или овальное ядро с плотно агрегированным хроматином и обычно узкий ободок цитоплазмы без отчетливых гранул. Большие и средние лимфоциты - это округлые клетки диаметром соответственно 12-15 и 8- 12 мкм. Их ядра напоминают ядра малых лимфоцитов, но имеют менее плотный хроматин и более выраженные ядрышки. Ободок цитоплазмы у них несколько шире, чем у малых лимфоцитов. В крови могут встречаться лимфоциты, имеющие разный объем цитоплазмы и размеры ядра. Не вызывает сомнения, что соотношение содержания в крови лимфоцитов разного размера (так же, как соотношение палочко- и сегментоядерных нейтрофилов) отражает состояние активации иммунной системы. Преобладающие в крови малые лимфоциты являются метаболически инертными клетками с незначительными энергетическими затратами. Четких гистохимических критериев различия лимфоцитов разных типов до настоящего времени не найдено, поскольку наборы ферментов и других биологически активных веществ в клетках разных субпопуляций различаются несущественно. Хотя в Т-лимфоцитах отмечено более высокое содержание кислой фосфатазы и β - глюкоуронидазы, а в В-клетках выше уровень гликогена, четкая идентификация этих клеток по присутствию в них указанных веществ невозможна из-за больших колебаний их количества в клетках других субпопуляций. Поэтому для идентификации лимфоцитов разных субпопуляций используются физиологические методы, основанные на определении поверхностных маркеров или функциональной активности клеток [33].

Выделяют 3 основных типа лимфоцитов —Т-, В- и естественные киллеры. НК-клетки относят к клеткам врожденного иммунитета, которые распознают молекулы (стрессорные молекулы), отличные от распознаваемых миелоидными клетками. В- и Т-лимфоциты распознают антигены, однако это распознавание происходит по-разному. Иммуноглобулиновый рецептор В-

клеток (BCR) дает им возможность распознавать нативный антиген как в свободной, так и в связанной с мембранами формах. Рецептор Т-клеток (TCR) распознает только фрагменты антигена, связанные с молекулами МНС. В процессе дифференцировки в Т- и В-лимфоцитах происходит перестройка генов, кодирующих рецепторы для антигенов. В результате каждая клетка экспрессирует рецептор, уникальный по специфичности. Рецепторы такой же специфичности имеют все потомки этой клетки (клон). В процессе селекции погибает большинство опасных аутоспецифических клонов как Т-, так и В-клеток. Популяции Т- и В-лимфоцитов участвуют в иммунных реакциях клонального типа, при которых в ответ вовлекаются только клетки клонов, экспрессирующих рецепторы нужной специфичности (в отличие от естественных киллеров, не отличающихся друг от друга по специфичности). Популяции лимфоцитов гетерогенны не только по структуре антигенраспознающего рецептора. К естественным (т.е. формирующимся в процессе нормальной дифференцировки, не связанной с действием чужеродных антигенов) относят 3 субпопуляции В-клеток. В1-клетки локализованы в серозных полостях и барьерных тканях, несут рецептор с низкой специфичностью к антигену, спонтанно вырабатывают низкоаффинные антитела преимущественно IgM-изотипа, в том числе к аутоантигенам. В-клетки маргинальной зоны — клетки, сходные с В1, но локализующиеся в маргинальной зоне селезенки. В2-клетки, которые мы привыкли называть обычными В-клетками, локализованы в селезенке и лимфатических узлах (в том числе в фолликулах), костном мозгу, лимфоидных тканях кишечника; эти клетки отвечают за образование высокоспецифичных и высокоаффинных антител разных изотипов. Число естественных субпопуляций Т-лимфоцитов значительно больше. Прежде всего это — $\gamma\delta$ Т и $\alpha\beta$ Т-клетки, отличающиеся типом TCR, а следовательно специфичностью распознавания и спектром функций. Среди $\alpha\beta$ Т-клеток выделяют НКТ-лимфоциты, совмещающие большинство функций НК клеток и некоторые функции Т-лимфоцитов. От обычных $\alpha\beta$ Т-клеток они отличаются ограниченностью репертуара

специфичностей TCR и преимущественным участием в распознавании липидных (а не пептидных) эпитопов. Среди «классических» $\alpha\beta$ Т-клеток выделяют субпопуляции CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, отличающиеся двумя основными особенностями — распознаванием антигенных пептидов в составе разных молекул МНС (соответственно классов II и I) и функцией: после стимуляции антигеном CD4⁺ Т-клетки выступают в качестве хелперов, а CD8⁺ Т-клетки — в качестве цитотоксических Т-лимфоцитов. Если CD8⁺ Т-клетки в процессе иммунного ответа функционируют как единая субпопуляция, то среди CD4⁺ клеток выделяют несколько «адаптивных» субпопуляций, о которых будет сказано ниже. Однако существует одна естественная субпопуляция CD4⁺ Т-клеток, существенно отличающаяся от остальных Т-хелперов — естественные регуляторные Т-клетки. Их функция состоит в контроле активности аутоспецифических клонов Т-лимфоцитов, не удаленных в процессе отрицательной селекции, мигрировавших в периферический отдел иммунной системы и создающих опасность аутоагрессии. Лимфоциты, особенно Т-клетки, постоянно рециркулируют — выходят из лимфоидных органов в лимфу, мигрируют с ней в кровотоки и возвращаются через посткапиллярные венулы обратно в орган. При этом благодаря экспрессии молекул адгезии и рецепторов для хемокинов рециркулирующие клетки при каждом «витке» рециркуляции с высокой избирательностью попадают в участки лимфоидных органов, специализированные для этого типа клеток. Некоторые миелоидные и лимфоидные клетки (в особенности ранее контактировавшие с антигеном) диффузно распределяются в барьерных и в меньшей степени — в других нелимфоидных тканях. Клетки иммунной системы существенно различаются по сроку жизни. В соответствии с этим варьирует скорость их обновления [16,24].

1.1.1 Т-лимфоциты. Механизмы развития клеточного иммунитета

Клеточный иммунный ответ, осуществляемый Т-лимфоцитами, направлен на защиту от внутриклеточных патогенов. В зависимости от локализации патогенов в цитозоле или в гранулах различают 2 варианта клеточного иммунного ответа — цитотоксический и воспалительный. Характер иммунного ответа в наибольшей степени зависит от доминирующего направления дифференцировки Т-клеток, играющих универсальную роль в развитии иммунного ответа: они выступают в качестве не только хелперов и регуляторов, но и эффекторов, выполняющих собственные защитные функции. 4 основных типа эффекторных Т-клеток, определяющих развитие иммунного ответа: цитотоксический Т-лимфоцит (CTL) и хелперные клетки типа Th1, Th2, Th17 [22].

Цитотоксический иммунный ответ осуществляют Т-лимфоциты, экспрессирующие корецептор CD8. Это определяет главную особенность процесса распознавания антигенов при цитотоксическом ответе: антигенный пептид презентруется в составе молекул МНС-I (поскольку именно к этим молекулам проявляет сродство корецептор CD8). Особая важность этого варианта распознавания обусловлена тем, что, в отличие от молекул МНС-II, молекулы МНС-I локализуются на всех ядросодержащих клетках организма, а не только на специализированных АПК. Вторая особенность этой формы иммунного ответа состоит в том, что в основе его эффекторных механизмов лежит контактный цитолиз, т.е. та же форма цитолиза, которая характерна для естественных киллеров — лимфоидных клеток врожденного иммунитета. Фактически цитотоксические Т-лимфоциты дублируют функции естественных киллеров, однако Т-клетки реализуют контактный цитолиз на основе специфического распознавания конкретных антигенов возбудителя и формируют иммунологическую память [18].

Цитотоксический иммунный ответ проходит в 4 этапа:

1. Презентация дендритными клетками антигена CD8⁺ Т-лимфоцитам, приводящая к их активации.
2. IL-2-зависимая пролиферация CD8⁺ Т-клеток, аутокринная или индуцируемая CD4⁺ Т-лимфоцитами.
3. Дифференцировка CD8⁺ Т-клеток в цитотоксические Т-лимфоциты, сопутствующая пролиферации.
4. Реализация цитолиза клеток-мишеней.

Участвует он преимущественно в защите от вирусных инфекций, а также от некоторых одноклеточных патогенов (лямблии, трихомонады). Кроме того, ему принадлежит важная роль в противоопухолевой защите. Отсюда дендритные клетки доставляют антигенные пептиды в лимфоидные органы, в типичном случае — в региональные лимфатические узлы. В Т-зонах этих органов (паракортикальных зонах лимфоузлов, параартериальных муфтах селезенки) антигены презентуются одновременно CD8⁺ и CD4⁺ Т-клеткам. Здесь же происходит пролиферативная экспансия клонов и дифференцировка цитотоксических Т-лимфоцитов. Благодаря смене мембранных молекул адгезии и хемокиновых рецепторов, о чем говорилось выше, цитотоксические Т-лимфоциты мигрируют в нелимфоидные ткани, преимущественно барьерные. В эпителии слизистой оболочки кишечника они составляют преобладающий клеточный тип [5,16].

В очагах инфицирования вирусами и другими патогенами цитотоксические Т-лимфоциты реализуют иммунный цитолиз. Поскольку его основные варианты сводятся к индукции апоптоза клеток-мишеней, которые удаляются путем фагоцитоза еще до их распада, цитолиз не сопровождается развитием воспалительной реакции и повреждением тканей.

Цитотоксические реакции, осуществляемые естественными киллерами и цитотоксическими Т-лимфоцитами, отличаются друг от друга в основном специфичностью цитолиза (Т-клетки атакуют клетки, презентующие в составе МНС-I чужеродные пептиды). Таким образом, клетки адаптивного

иммунитета используют эффекторную реакцию, сформировавшуюся в рамках врожденного иммунитета, проявляя при этом более высокую избирательность, прицельность действия. Другое приобретение адаптивного иммунитета — формирование иммунологической памяти, благодаря чему при повторном инфицировании тем же вирусом пораженные клетки устраняются быстрее и эффективнее. После успешного завершения цитотоксического иммунного ответа происходит быстрая и радикальная ликвидация последствий реакции для самой иммунной системы — устранение последствий интенсивной экспансии клонов цитотоксических Т-лимфоцитов, участвовавших в иммунном ответе. В течение нескольких дней после завершения ответа 90–95% цитотоксических Т-лимфоцитов подвергается апоптозу. В то же время завершается формирование популяции CD8⁺ Т-клеток памяти, которые сами по себе лишены цитотоксической активности, но быстро приобретают ее при повторном распознавании специфического антигена.

Воспалительный Т-клеточный иммунный ответ, эта форма иммунного ответа предназначена для защиты от внутриклеточных патогенов, локализующихся в цитоплазматических гранулах —микроорганизмов, фагоцитированных клетками, но не разрушенных из-за недостатка адекватных эффекторных механизмов или их блокады патогенами. Клеточный иммунный ответ воспалительного типа осуществляется в 4 этапа:

1. Презентация дендритными клетками антигена CD4⁺ Т-лимфоцитам, приводящая к их активации;
2. Развитие хелперных Т-лимфоцитов типа Th1;
3. Презентация антигена макрофагами ранее сформировавшимся Т-хелперам (Th1-типа), их взаимная активация и выделение цитокинов;
4. Активация цитолиза в фагосомах макрофагов.

За реализацию этой формы защиты отвечают Th1-клетки и макрофаги. Th1-клетки формируются на этапе запуска иммунного ответа и отвечают за специфическую составляющую реакции (распознавание антигена и

направление реакции на его носителя). Макрофаги выступают в качестве эффекторных клеток. Начальный этап реакции против внутриклеточных патогенов, локализованных в фаголизосомах, осуществляется так же, как при запуске любой формы иммунного ответа: дендритные клетки, захватившие патоген или его фрагмент, презентируют антигенный пептид CD4+ Т-клеткам, которые активируются, пролиферируют и дифференцируются в хелперные Т-лимфоциты. Уже на этапе распознавания антигена происходит ориентация дифференцировки CD4+ Т-лимфоцитов в хелперы Th1-типа, которая затем поддерживается цитокинами, продуцируемыми дендритными клетками — IL-12, IFN γ [5,6].

1.1.2 В-лимфоциты. Механизмы развития гуморального иммунитета

Основная задача гуморального иммунного ответа состоит в образовании антител, специфичных к антигенам возбудителей. Эти антитела обеспечивают защиту от внеклеточных патогенов путем их прямой блокады или привлечения дополнительных факторов цитотоксичности. Антителообразующие клетки являются производными В-лимфоцитов. Таким образом, клетки В-ряда служат основными исполнителями этой формы иммунного ответа. В качестве хелперных клеток выступают преимущественно Th2-лимфоциты [3,16].

Выделяют 4 этапа превращения В-лимфоцитов при гуморальном иммунном ответе:

1. Стимуляция В-клетки антигеном с участием Т-хелперов;
2. Активация и пролиферация В-клеток (экспансия клона);
3. Переключение изотипа рецептора В-клетки и «созревание» его аффинитета;
4. Дифференцировка В-клеток в плазматические клетки и В-клетки памяти.

В-лимфоциты являются клетками с двойственной функцией. С одной стороны, это антигенраспознающие лимфоциты, способные

дифференцироваться (обычно при участии Т-хелперов) в эффекторные клетки — антителопродуценты. С другой стороны, В-лимфоциты служат «профессиональными» АПК, способными активировать хелперые Т-лимфоциты. Схема их участия в гуморальном иммунном ответе, особенно при взаимодействии с Т-хелперами, очень сходна с аналогичной схемой участия макрофагов в клеточном ответе воспалительного типа [2,31].

Несмотря на то, что контакт В-лимфоцитов с патогенами и их продуктами возможен в очагах поступления патогенов в организм, вовлечение этих клеток в первичный иммунный ответ возможно только во вторичных лимфоидных органах. Это обусловлено тем, что именно здесь создаются оптимальные условия для взаимодействия трех компонентов пусковой реакции — антигена, наивной В-клетки и Т-хелпера типа Th2. Это взаимодействие происходит в межфолликулярном пространстве или «короне» фолликула, где В- и Т-лимфоциты соседствуют друг с другом. Антиген доставляется в эти зоны не только в составе молекул МНС на поверхности дендритных клеток, но и в свободной форме [28,29].

Антигенсвязывающие рецепторы В-лимфоцитов — BCR — способны взаимодействовать как со свободным, так и мембраносвязанным антигеном в его нативной, нерасщепленной форме. Связывания антигена, самого по себе, недостаточно для активации В-клетки. Оно как бы обозначает те клоны В-лимфоцитов, которым предстоит участвовать в иммунном ответе. Для полноценной активации В-клетки требуется дополнительный сигнал, порождаемый контактным взаимодействием с Т-хелпером (Th2) [3].

При взаимодействии антигена с BCR должен быть выполнен ряд условий, определяющих эффективность распознавания антигена. Прежде всего необходимо перекрестное сшивание иммуноглобулиновых рецепторов или иная форма их агрегации. Связывание антигеном двух и более рецепторов возможно при наличии в молекуле антигена повторяющихся эпитопов, что не характерно для белковых антигенов. Поэтому в действительности срабатывают другие, неспецифические механизмы агрегации мембранных рецепторов.

Связывание антигена и агрегация BCR обуславливают конформационные изменения в мембранном иммуноглобулине. Эти изменения передаются на димер $Ig\alpha/Ig\beta$ (CD79a/b), а через него — на рецепторные киназы, которые при этом активируются. Важное усиливающее событие — взаимодействие антигена не только с мембранным IgM, но и с другими составляющими рецепторного комплекса [5,17].

Образование комплекса антигена с мембранными рецепторами-антителами приводит к активации комплемента по классическому пути и расщеплению фактора C3 сначала до C3b, затем — до iC3b и C3d. Входящая в состав рецепторного комплекса В-клеток молекула CD21 является рецептором для комплемента (CR2), способным связывать фрагмент C3d. Возникающее при этом изменение конформации молекулы CD21 передается молекуле CD19 и вызывает активацию рецепторных тирозинкиназ, связанных с цитоплазматической частью CD19. Сочетанная активация тирозинкиназ, связанных с молекулами CD79 и CD19, формирует первый сигнал, ответственный за вовлечение в иммунный ответ клонов В-клеток, распознавших антиген.

1.2 Реакция бласттрансформации лимфоцитов как проявление их функциональной активности

Контакт лимфоцита с чужеродным антигеном или неспецифическим митогеном сопровождается активацией и реакцией бласттрансформации (РБТЛ), т.е. пролиферацией клетки с переходом малых лимфоцитов в бласты, способных к делению и дальнейшей дифференцировке. При первичном контакте организма с антигеном последний действует на некоммутированные, или необученные, малые лимфоциты, индуцируя их превращение в бласты. Однако интенсивность бласттрансформации при этом незначительна. Затем в определенной части случаев из этих бластов образуются уже обученные, или коммутированные, лимфоциты (клетки памяти), которые по своим

морфологическим данным также являются малыми лимфоцитами. Повторное попадание антигена в организм вызывает более выраженную бласттрансформацию лимфоцитов т. к. антиген действует уже на коммитированные лимфоциты. Одна бластная клетка может дать клон из 16-64 клеток. РБТЛ сопровождается изменением морфологии и метаболизма клетки с восстановлением синтеза ДНК уже через 1-2 часа, интенсификации синтеза белка, изменением фосфолипидного обмена, проницаемости мембраны для ионов, аминокислот, сахаров, нуклеозидов, что и служит критериями оценки функциональной активности лимфоцитов [7,33].

Для активации Т-лимфоцитов чаще всего используется фитогемагглютинин, который является гликопротеидом с значительным содержанием цистеина, метионина и имеет молекулярный вес 128 000 дальтон, а также Кон А белок, выделенный из семян растения молекулярной массой 68 000. А митогеном для В-лимфоцитов служит липополисахарид *E. coli*. Пролиферативную активность Т-лимфоцитов оценивают по интенсивности синтеза ДНК в ответ на стимуляцию митогеном или распространенные антигены (туберкулин, аллоантигены). Митогены стимулируют пролиферацию значительной части Т-лимфоцитов, поэтому результат оценивают обычно через 3 суток. Специфические антигены стимулируют пролиферацию только тех Т-лимфоцитов, которые несут TCR-рецептор к ним, поэтому индуцированную антигеном пролиферацию оценивают через 5-7 суток [10,36].

1.3 Метаболизм клеток иммунной системы

Метаболизм клеток иммунной системы может быть исследован широким спектром аналитических методов. Однако спектрофотометрический метод как наиболее широко используемый в лабораторной диагностике не всегда может быть применим из-за большого объема исследуемого материала. В связи с этим, остановимся на описании двух видов анализа – оптимальных к применению для

определения активности ферментов в клетках иммунной системы – это биолюминесцентный и цитоморфоденситометрический анализ [14,20].

Под люминесценцией понимается широкий ряд реакций, в которых возбужденные молекулы переходят в основное состояние с испусканием кванта света. При биолюминесценции образование электронновозбужденного состояния одной из молекул, участвующей в процессе, происходит с помощью ферментативной реакции [20].

Все ферментативные реакции, в процессе которых происходит наработка или утилизация субстратов или кофакторов данной биферментной системы, могут быть исследованы с помощью биолюминесцентных методов. В перечень определяемых биолюминесцентным методом ферментов, субстратов и кофакторов можно также включить показатели, которые могут быть исследованы с помощью сопряженных реакций [14,30].

Перспективность применения биолюминесцентных методов исследования определяется несколькими факторами: 1 – конечным продуктом люциферазной реакции является свет, который легко и с большой точностью измеряется при помощи современной электронно-оптической техники. Пределы обнаружения АТФ и НАДН составляют соответственно 10^{-10} и 10^{-16} моль/л. Биолюминесцентный метода анализа НАДН обладает в 25000 раз более высокой чувствительностью по сравнению со спектрофотометрией; 2 – в основе светоизлучения лежат ферментативные реакции, что определяет высокую специфичность метода; 3 – экспрессность и высокая чувствительность метода позволяет проводить исследования в микрообразцах биологического материала с минимальным количеством реактивов. Это не только снижает стоимость исследования, но и позволяет использовать биолюминесцентный метод в клинической практике [20,17].

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Пациенты

Обследовано 12 больных распространенным гнойным перитонитом внебольничного и госпитального происхождения, проходивших лечение в отделении гнойной хирургии и отделении реанимации и интенсивной терапии МУЗ «ГБСМП имени Н.С. Карповича» г. Красноярск. Так же обследовано 32 относительно здоровых человека, забор крови контрольной группы осуществлялся в Красноярском краевом центре крови №1.

Все исследования выполнены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266 [16].

2.2 Реакция бласттрансформации лимфоцитов и методика постановки

Реакция бласттрансформации основана на феномене активации лимфоцитов под влиянием стимулов (митогенов или антигенов) с последующей трансформацией их в бласты (большие делящиеся клетки). Эта реакция определяет пролиферативный потенциал изучаемых клеток [13].

Реакцию осуществляют следующим образом: к суспензии лимфоцитов или лейкоцитов крови приливают раствор митогена или антигена в концентрации, нетоксичной для клеток, но способной вызывать бласттрансформацию. Инкубируют в среде CO₂ при 37⁰С. По окончании культивирования эритроциты лизируют и подсчитывают количество клеток, трансформировавшихся в бласты. В качестве активаторов РБТЛ обычно используют фитогемагглютинин (ФГА), конканавалин А (Кон А),

митогенлактоза (МЛ), бактериальные липополисахариды (ЛПС), ферменты, стафилококковый экстракт и др. Таким образом, подбирая митогены, можно изучать функциональную активность отдельных субпопуляций лимфоцитов [14].

Постановка реакции и культивирование должны осуществляться в стерильных условиях. Поскольку оптимальные дозы антигенов и митогенов и время инкубации для каждого случая индивидуальны, то рекомендуется применять несколько доз стимуляторов и разное время культивирования. Метод РБТЛ достаточно распространен в лабораториях клиник медицинских институтов, причем используется в многочисленных модификациях [8,14].

- 1) Произвели забор периферической крови в вакутейнеры по 10 мл.
- 2) Кровь отстаивается, после чего наслаиваем лейко-взвесь (Л) на Фикол (Ф) (1,077) в соотношении 1.5Л на 1Ф. Центрифугируем 40 минут на 1500 оборотах при температуре 4⁰С (центрифуга с охлаждением). Собираем кольца, отмываем избыточным количеством физраствора (Хэнкс или среда). Отмытые клетки считаем, 1×10^6 клеток отбираем в эмпендорф и замораживаем (био). Сконцентрированные и посчитанные клетки окрашиваем -5,6-карбоксихлорофлуоресциендиацетат-сукцинилмидин эфиром (CFSE): в концентрированные клетки добавляем 2,5мкл приготовленного CFSE после чего инкубируем при 37⁰С в течение 15 минут, затем трижды отмываем избыточным количеством охлажденной до 4⁰С 1640 среды. Окрашенные и отмытые клетки помещаем в инкубационный матрас с добавлением 5мл среды (1640+10% аутологичной сыворотки), а так же нетоксичная концентрация антибиотиков. Матрасы помещаются в СО₂ инкубатор и инкубируются при 37⁰С в течение 24 часов.
- 3) По завершению суточной инкубации необходимой для выхода из клетки излишков краски, содержимое матрасов сливается и центрифугируется с дополнительной отмывкой. После часть отмытых и сконцентрированных клеток отбирается для проточной цитометрии, оставшиеся клетки

разделяются на 2 линии (спонтанная и индуцированная): 1. Окрашенные клетки помещаются в инкубационный матрац с добавлением 5 мл полной питательной среды (1640, 10% аутологичной сыворотки, нетоксичная концентрация антибиотиков) и помещается в CO₂ инкубатор при температуре 37⁰С на 48 часов; 2. Окрашенные клетки помещаются в инкубационный матрац с добавлением 5мл полной питательной среды, а также 25 мкл фитогемаглютина (ФГА (в соотношении 5мкл/1мл среды)) и помещаются в CO₂ инкубатор при температуре 37⁰С на 48 часов.

- 4) Через 48 часов с момента добавления ФГА из матрасов обеих линий отбирается по 2мл раствора, сразу же восполняемые эквивалентным объемом 1640 среды. Манипуляцию повторяем через 48 часов, а остаток минерала забираем по истечению 48 часов. Таким образом у нас получаются следующие точки: 1. Сутки после окраски до добавления ФГА (исходное состояние лимфоцитов); 2. 48 часов после добавления ФГА (начало полиферации, активное накопление ДНК); 3. 72 часа после добавления ФГА (активная пролиферация Т-клеток)
- 5) После отбора материала на любой из точек, в первую очередь производим отмывку клеточного материала от среды (1640 среда дает сильную засветку), после чего отмые и сконцентрированные клетки подсчитываются и 1×10^6 мил/мл отбираются для проведения билюминесцентного анализа (если количество клеток в образце маленькое, отбирается $0,5 \times 10^6$ мил/мл). Оставшийся материал дополнительно окрашивается моноклональными антителами в соответствии с протоколом. После чего материал промеряется на проточном цитометре с выделением интересующих нас популяций лимфоцитов, также определяется количество циклов деления и количество активированных клеток относительно общего их количества.

2.3 Билюминесцентный анализ

Билюминесцентное определение активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ проводится по ранее разработанным методикам. Для этого суспензию выделенных лимфоцитов, содержащую клетки в концентрации 1,0 млн/мл, после однократного замораживания-размораживания дополнительно разрушали путем осмотического лизиса с добавлением дистиллированной воды (1:5 по объему) и 1,0-2,0 мМ дитиотреитола. Затем производили непосредственное определение активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ. Для этого в 150 мкл инкубационной смеси, содержащей соответствующий субстрат и кофактор, вносили 50 мкл суспензии разрушенных лимфоцитов. Конкретные значения концентраций субстратов и кофакторов, а также рН среды для определяемых ферментов представлены в таблице 1. Необходимо отметить, что в инкубационную смесь для определения активности НАДФИЦДГ и НАДИЦДГ дополнительно добавляли АДФ в концентрациях 2,15 и 1,3 мМ соответственно. В среду инкубации для определения уровней НАДНГДГ и НАДФНГДГ дополнительно вносили NH_4Cl в концентрации 5,0 мМ, а для определения ГР – ЭДТА в концентрации 0,5 мМ [21,38].

Таблица 1 - Концентрация субстратов, кофакторов и показатели рН среды для определения активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах биолюминесцентным методом

Фермент	Субстрат, мМ	Кофактор, мМ	рН буфера
Г6ФДГ	Г6Ф – 1,5	НАДФ – 0,025	9,8
Г3ФДГ	Г3Ф – 0,5	НАД – 0,35	9,8
ЛДГ	Лактат – 2,0	НАД – 0,50	9,0
МДГ	Малат – 2,0	НАД – 2,50	9,8
НАДФМДГ	Малат – 7,5	НАДФ – 0,375	9,8
НАДФГДГ	Глутамат – 0,5	НАДФ – 1,65	9,8
НАДГДГ	Глутамат – 8,7	НАД – 8,10	9,8
НАДИЦДГ	Изоцитрат – 5,0	НАД – 5,0	7,8
НАДФИЦДГ	Изоцитрат – 1,375	НАДФ – 0,075	7,4
НАДНЛДГ	Пируват – 0,25	НАДН – 0,005	7,0
НАДНМДГ	Оксалоацетат – 0,5	НАДН – 0,005	7,0
ГР	GSH – 0,5	НАДФН – 0,0025	7,4
НАДФНГДГ	Оксоглутарат – 100	НАДФН – 0,0025	7,4
НАДНГДГ	Оксоглутарат – 100	НАДН – 0,0025	7,0

Примечание: среды с рН 9,0 и 9,8 готовили на Трис-НСl буфере; с рН 7,0, 7,4 и 7,8 – на К⁺,Na⁺-фосфатном буфере.

После инкубации исследуемых проб при 37°C в течение 30 минут (для ферментативных реакций с восстановлением НАД(Ф)⁺) или 5 минут (для реакций с окислением НАД(Ф)Н) к 200 мкл инкубационной смеси добавляли 50 мкл флавиномононуклеотида (ФМН) в концентрации 1,5x10⁻⁵М, 50 мкл 0,0005% миристинового альдегида и 10 мкл ферментативной системы НАД(Ф)Н:ФМНоксидоредуктаза-люцифераза (все реактивы биолюминесцентной системы разведены в 0,1 М К⁺,Na⁺-фосфатном буфере с рН 7,0). После смешивания биолюминесцентных реактивов и инкубационной пробы с помощью биолюминометра “БЛМ-8803” производили измерение свечения [35].

Учитывая, что в клетках имеется определенное количество субстратов для течения различных метаболических реакций, в том числе и катализируемых исследуемыми ферментами, нами определялись показатели, условно названные “субстратный фон ферментов”.

Определение производили в тех же условиях, что и для вышеперечисленных дегидрогеназ, но в инкубационную смесь вместо соответствующего субстрата вносили буфер. В результате измерения свечения на биолюминометре получают относительные значения активности исследуемых ферментов. Чтобы получить абсолютные значения активности необходимо построить график зависимости интенсивности биолюминесценции от концентрации НАД(Ф)Н (калибровочный график). Для этого 200 мкл стандартного раствора НАД(Ф)Н в диапазоне 10^{-9} – 10^{-4} М вносили в кювету биолюминометра, содержащие биолюминесцентные реактивы в концентрациях указанных выше, после чего производилось измерение интенсивности биолюминесценции. В связи с широким диапазоном рН буферов, используемых для определения дегидрогеназной активности, а также рН-зависимостью биолюминесценции ферментативной системы, калибровочные графики строились для каждого рН буфера [21,35].

Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ рассчитывали по формуле:

$$A = (\Delta[C] * V * 10^6) / T$$

где $\Delta[C]$ – разница концентраций НАД(Ф)Н в пробах “фермент” и “фон фермента”; V – объем пробы в миллилитрах; T – время инкубации (30 мин).

Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ выражали в ферментативных единицах на 10^4 клеток, где 1 Е=1 мкмоль/мин.

В связи с широким диапазоном рН буферов, используемых для определения дегидрогеназной активности, а также рН-зависимостью биолюминесценции ферментативной системы, калибровочные графики строились для каждого рН буфера. На рисунке 1 представлен пример подобной зависимости.

Воспроизводимость метода оценивали путем определения активности каждого фермента не менее чем в 10 повторах. Ошибка метода не превышала 5% [33].

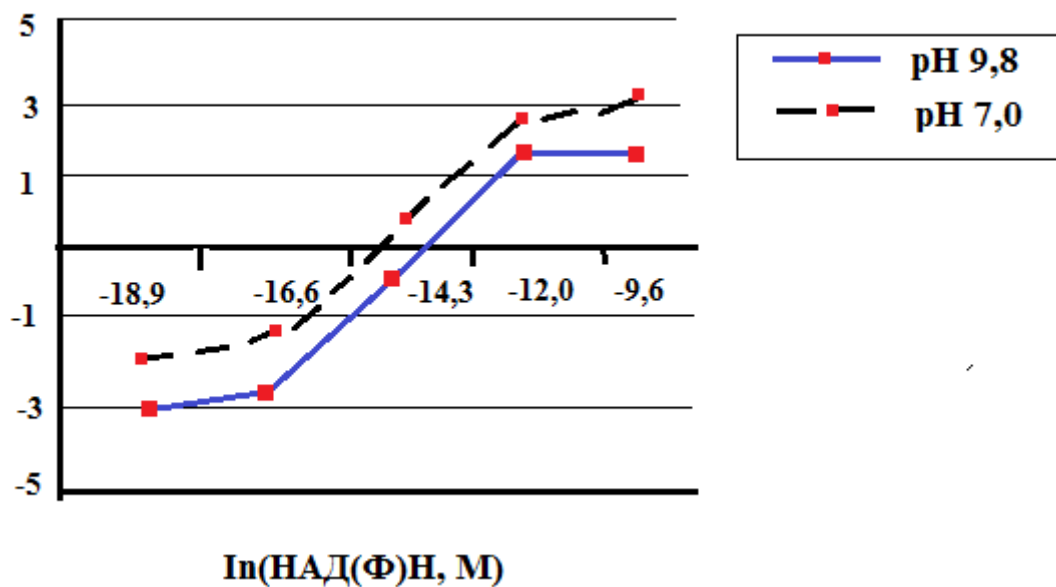


Рис. 1 Интенсивность билюминесценции НАД(Ф)Н:ФМНоксидоредуктазы-люциферазы в зависимости от концентрации НАД(Ф)Н и pH буфера.

2.4 Проточная цитометрия

Проточная цитометрия — метод исследования дисперсных сред в режиме поштучного анализа элементов дисперсной фазы по сигналам светорассеяния и флуоресценции. Название метода связано с основным приложением, а именно, с исследованием одиночных биологических клеток в потоке.

Основа метода заключается в:

1. Использовании системы гидрофокусировки, которая обеспечивает прохождение клеток в потоке поодиночке;
2. Облучении клетки лазерным излучением;
3. Регистрации сигналов светорассеяния и флуоресценции от каждой клетки.

Кроме того, в ходе анализа учитывается уровень флуоресценции химических соединений, входящих в состав клетки (аутофлуоресценция) или внесённых в образец перед проведением проточной цитометрии. За образцы берут кровь, костный мозг, ликвор, суставная жидкость, плевральная жидкость, асцитическая жидкость, суспензированные клетки тканей [26].

Принцип метода проточной цитометрии основан на регистрации флуоресценции и светорассеяния от каждой отдельно взятой клетки в клеточной суспензии. Суспензия клеток под давлением подается в проточную ячейку, где за счет разности давлений между образцом и обтекающей жидкостью клетки, находясь в ламинарном потоке жидкости, выстраиваются в цепочку друг за другом (Рис. 2).

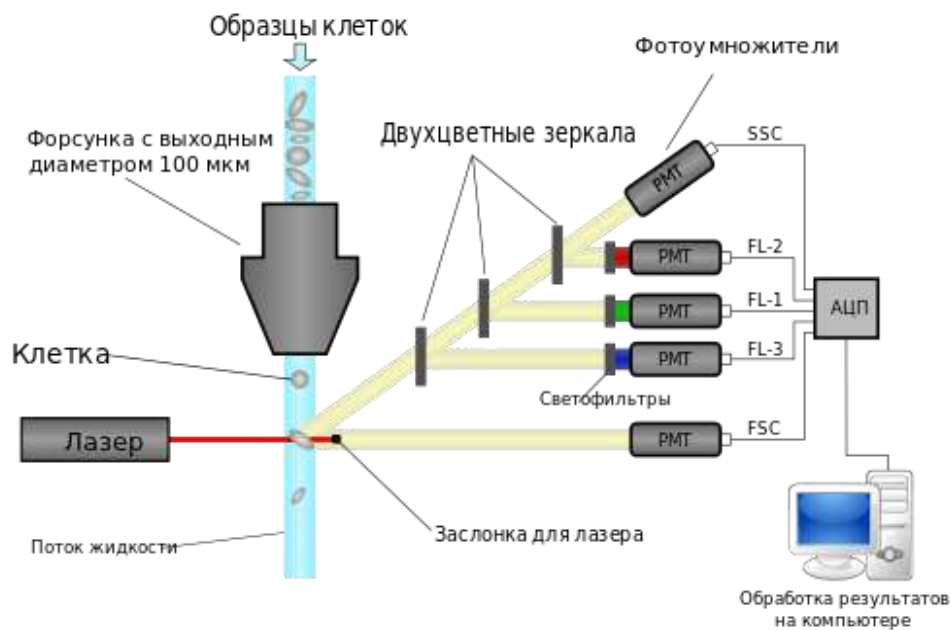


Рис. 2 Схема оборудования для проведения проточной цитометрии

Клетки одна за другой проходят через лазерный луч, а высокочувствительные детекторы, расположенные вокруг проточной ячейки регистрируют флюоресценцию и рассеянное лазерное излучение каждой клетки. Полученный сигнал передается в компьютер, обрабатывается, и полученные данные отображаются в виде различных графиков и гистограмм.

Прямое (малоугловое) светорассеяние – forward scatter (FSC). Детектор прямого светорассеяния располагается по ходу лазерного луча за проточной ячейкой и регистрирует излучение разера, которое рассеивается под углами 2-19 градусов. Интенсивность рассеянного под малым углом света пропорциональна размеру клетки. Более крупные клетки рассеивают свет сильнее мелких.

Боковое светорассеяние – side scatter (SSC). Внутреннее содержимое клеток оптически неоднородно. Луч лазера, проходя сквозь клетку, многократно преломляется и рассеивается во все стороны. Полученная при регистрации этого излучения информация позволяет судить о сложности внутреннего строения клетки (соотношение ядро-цитоплазма, наличие гранул, других внутриклеточных включений) [27,40].

Комбинация бокового и прямого светорассеяния позволяет судить о морфологии клетки в целом, выделять различные популяции клеток (лимфоциты, моноциты, гранулоциты) для дальнейшего анализа.

Система для регистрации свечения флюоресцентных меток состоит из комплекса светофильтров и фотоумножителей, каждый из которых регистрирует излучение в диапазоне длин волн, соответствующих флуорохрому. Выбор типа и количества флуоресцентных красителей определяется поставленной задачей для данного исследования. Основными типами таких красителей являются моноклональные антитела, конъюгированные с флюоресцентной меткой (FITC, PE, APC, PerCP и др.) для определения мембранных и цитоплазматических антигенов клетки, красители, позволяющие оценить жизнеспособность клеток (7AAD, PI) флуорофоры, связывающиеся с нуклеиновыми кислотами (DAPI, Hoechst), pH-чувствительные флуорофоры (Fluo-3), ион-зависимые флуорофоры (Indo-1) [40].

Полученные данные обрабатываются компьютером и отображаются в виде одномерных гистограмм или двух- и трехмерных точечных или плотностных графиков. Анализ данных позволяет определить количество клеток, отвечающих тем или иным условиям, оценить интенсивность флуоресценции (т.е. плотность того или иного маркера на поверхности клетки). В некоторых случаях при помощи проточного цитометра можно определить абсолютное число клеток в исследуемом образце [26].

Область применения проточной цитометрии весьма разнообразна. Помимо морфологических характеристик клеток с помощью моноклональных антител можно достоверно определять популяционный и субпопуляционный состав лимфоцитов, выявлять стадию дифференцировки и активации клеток, оценивать уровень функциональной активности лимфоцитов, определять внутриклеточные и секретируемые цитокины, проводить исследования фагоцитоза, анализировать клеточный цикл, оценивать апоптоз и пролиферацию. Основные популяции лимфоцитов периферической крови

здоровых лиц представлены в таблице 2. Эти показатели можно считать нормативными при проведении иммунологических исследований [27].

Таблица 2 - Интервалы распределения основных и малых популяций лимфоцитов в периферической крови практически здоровых лиц

Популяции и субпопуляции лимфоцитов	Содержание	
	относительное, %	абсолютное, ×10 ⁹ /л
В-клетки (CD3-CD19+HLA-DR+CD45+)	7,0 – 17,0	0,111 – 0,376
В1-клетки (CD19+CD5+CD27-CD45+)	0,5 – 2,1	0,022 – 0,115
В2-клетки (CD19+CD5-CD27-CD45+)	6,5 – 14,9	0,081 – 0,323
В-клетки памяти (CD19+CD5-CD27+CD45+)	1,8 – 6,8	0,012 – 0,040
НК-клетки (CD3-CD16+CD56+CD45+)	8,0 – 18,0	0,123 – 0,369
НК-клетки цитолитические (CD3- CD16+CD56dimCD45+)	0,2 – 1,0	0,003 – 0,022
НК-клетки цитокин-продуцирующие (CD3-CD16- CD56brightCD45+)	7,8 – 17,0	0,120 – 0,347
TNK-клетки (CD16-CD56+CD3+CD45+)	0,5 – 6,0	0,007 – 0,165
T-клетки (CD3+CD19-CD45+)	61,0 – 85,0	0,946 – 2,079
T-хелперы (CD3+CD4+CD8-CD45+)	35,0 – 55,0	0,576 – 1,336
T-цитотоксические (CD3+CD8+CD4-CD45+)	19,0 – 35,0	0,372 – 0,974
T-хелперы активированные / памяти (CD4+CD45R0+CD45RA±CD45+)	5,0 – 25,0	0,068 – 0,702
T-хелперы наивные (CD4+CD45RA+CD45R0-CD45+)	20,0 – 40,0	0,272 – 1,123
T-лимфоциты активированные (CD3+HLA- DR+CD25+CD45+)	0,5 – 6,0	0,007 – 0,165
Регуляторные T-лимфоциты (CD4+CD25brightCD127- CD45+)	1,6 – 5,8	0,009 – 0,078
Индекс соотношения (T-хелперы / T-цитотоксические)	1,5 – 2,6	

2.5 Статистические методы исследований

По результатам исследований в пакете электронных таблиц MSMicrosoftExcel 2010 была сформирована база данных, на основе которой с помощью пакета прикладных программ Statistica 7,0 (StatSoft Inc., 2004) производился статистический анализ.

Непараметрические данные приведены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (25-й и 75-й процентиля): Me, (C₂₅ – C₇₅). Для сравнения связанных групп по количественным признакам использован критерий Вилкоксона для парных сравнений [34].

Анализ значений происходит в 3 точках: исходная, спонтанная, индуцированная.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из текста ВКР изъяты результаты интеллектуальной деятельности, которые имеют потенциальную коммерческую научную ценность в силу неизвестности их третьим лицам.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

MHC (major histocompatibility complex) – главный комплекс гистосовместимости

CD3- (cluster of differentiation 3) - поверхностный маркер, специфичный для всех клеток субпопуляции Т-лимфоцитов

CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester) - 5,6-карбокCIFлуоресциендиацетат-сукциннилмидин эфир

BCR – В-клеточные рецепторы

CTL- цитотоксические Т-лимфоциты

РБТЛ-реакция бласттрансформации лимфоцитов

АПК – антигенпрезентирующая клетка

ФГА - фитогемаглютинин

ЛПС – липополисахариды

ФМН – флавинмоноклеотид

НАД(Ф) – никотинамидадениндинуклеотидфосфат

Г6ФДГ - глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа

НАДФМДГ - НАДФ-зависимая декарбокCилирующая малатдегидрогеназа

НАДФГДГ - НАДФ-зависимая глутаматдегидрогеназа

НАДФИЦДГ - НАДФ-зависимая изоцитратдегидрогеназа

НАДНЛДГ - НАДН-зависимая лактатдегидрогеназа

НАДНМДГ – НАДН-зависимая малатдегидроген

ГР - глутатионредуктаза

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Adam T., Waickman A.T., Powell J.D. mTOR, metabolism, and the regulation of T-cell differentiation and function // *Immunol. Rev.* 2012. V. 249. № 1. P. 43–58.
2. Aubert M., Krantz E.M., Jerome K.R. Herpes simplex virus genes Us3, Us5, and Us12 differentially regulate cytotoxic T lymphocyte-induced cytotoxicity // *Viral. Immunol.* – 2006. – Vol. 19, N 3. – P. 391–408.
3. Bi Y., Yang R. Direct and indirect regulatory mechanisms in TH17 cell differentiation and functions // *Scand. J. Immunol.* – 2012. – Vol. 75, N 6. – P. 543–552.
4. Biswas S.K., Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm // *Nat. Immunol.* – 2010. – Vol. 11, N 10. – P. 889–896.
5. Bleackley R.C. A molecular view of cytotoxic T lymphocyte induced killing // *Biochem. Cell. Biol.* – 2005. – Vol. 83, N 6. – P. 747–751.
6. Bortell R., Moss J., McKenna R.C. et al. Nicotinamide adenine dinucleotide (nad) and its metabolites inhibit T lymphocyte proliferation: role of cell surface nad glycohydrolase and pyrophosphatase activities//*J. Immunol.* – 2001. – Vol.167, N 4. – P.2049–2059.
7. Campello S., Lacalle R.A., Bettella M. et al. Orchestration of lymphocyte chemotaxis by mitochondrial dynamics // *J. Exp. Med.* – 2006. – Vol. 203, N 13. – P. 2879–2886.
8. Diaz G.A., Koelle D.M. Human CD4⁺ CD25^{high} cells suppress proliferative memory lymphocyte responses to herpes simplex virus type 2 // *J. Virol.* – 2006. – Vol. 80, N 16. – P. 8271–8273.

9. Fisher G., Schwartz D.D., Quindry J. et al. Lymphocyte enzymatic antioxidant responses to oxidative stress following high-intensity interval exercise // *J. Appl. Physiol.* – 2011. – Vol. 110, N 3. – P. 730–737.
10. Green D.R., Scott D.W. Activation-induced apoptosis in lymphocytes // *Curr. Opin. Immunol.* – 1994. – Vol. 6, N 3. – P. 476–487.
11. Hadzic T., Li L., Cheng N., Walsh S.A. et al. The role of low molecular weight thiols in T lymphocyte proliferation and IL-2 secretion // *J. Immunol.* – 2005. – Vol. 175, N 12. – P. 7965–7972.
12. Li M., Li C., Allen A. et al. The structure and allosteric regulation of glutamate dehydrogenase // *Neurochem. Int.* – 2011. – Vol. 59, N 4. – P. 445–455.
13. Luider J.I., Cyfra M., Johnson P., Auer I. Impact of the new Beckman Coulter Cytomics FC 500 5-color flow cytometer on a regional flow cytometry clinical laboratory service. *Lab. Hematol.* 2004, V. 10, P. 102–108.
14. Mason E.F., Rathmell J.C. Cell metabolism: an essential link between cell growth and apoptosis // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2011. – Vol. 1813, N 4. – P. 645–654.
15. Pallardo F.V., Markovic J., García J.L., Vina J. Role of nuclear glutathione as a key regulator of cell proliferation // *Mol. Aspects Med.* – 2009. – Vol. 30, N 1 – 2. – P. 77–85.
16. Rosa L.F., de Almeida A.F., Safi D.A., Curi R. Thioglycollate stimulus modifies lymphocyte metabolism and proliferation // *Cell. Biochem. Funct.* – 1993. – Vol. 11, N 4. – P. 251–255.
17. Ройт А. Иммунология: учебное пособие / Бросстоф Дж. [и др.]. – Пер с англ. – М.: Мир, 2000. – 592 с.
18. Борисов А.Г. Кластерный анализ типов иммунных нарушений при инфекционно-воспалительных заболеваниях // *Российский иммунологический журнал*, 2014, Т. 8, № 4, С. 1002-1011.

19. Борисов А.Г., Савченко А.А., Смирнова С.В. К вопросу о классификации нарушений функционального состояния иммунной системы // Сибирский медицинский журнал – Томск, - 2008. - Т. 23, № 3-1. - С. 13-18.
20. Булыгин, Г. В. Метаболические основы регуляции иммунного ответа / Г. В. Булыгин, Н. И. Камзалакова, А. В. Андрейчиков. – Новосибирск: СО РАМН, 1999. – 340 с.
21. Владимиров, Ю.А. Активированная хемилюминесценция и биолюминесценция как инструмент в медико биологических исследованиях / Ю.А.Владимиров // Соросовский образовательный журнал. 2001. № 1. С.16-23.
22. Дроков, М.Ю. Исследование экспрессии организма в CD4+ лимфоцитах и Т-регуляторных клетках / М.Ю. Дроков // Иммунофенотипические характеристики Т клеточного звена иммунной системы – 2014. – № 1. – С. 14.
23. Зинченко В.П., Антонов С.А., Сергеев А.И. Конститутивно-активный кальциевый канал плазматической мембраны Т-лимфоцитов // Биологические мембраны: Журн. мембранной и клеточной биологии. – 2009. – Т. 26, № 4. – С. 293–297.
24. Козлов, В.А. Практические аспекты диагностики и лечения иммунных нарушений / Борисов А.Г. Смирнова С.В. Савченко А.А. // Издательство «Наука» Новосибирск - 2009.
25. Кудрявцев И.В. Т-клетки памяти: основные популяции и стадии дифференцировки // Российский иммунологический журнал, 2014. Т.8, № 4, С. 947–964.
26. Кудрявцев И.В., Субботовская А.И. Опыт измерения параметров иммунного статуса с использованием шести-цветного цитофлуориметрического анализа // Медицинская иммунология, 2015, Т. 17, № 1, С. 19-26.
27. Кудрявцев И.В., Елезов Д.С. Анализ основных популяций цитотоксических Т-лимфоцитов периферической крови на основании уровня экспрессии CD27,

CD28, CD45R0 и CD62L // Российский иммунологический журнал, 2013, Т.7, №2-3, С.57-61.

28. Новиков, Л. В. Клиническая иммунология и аллергология с основами общей иммунологии / А. Б. Новиков, Л.В. Ганковская, Р.Я. Мешкова // Клинически значимые характеристики клеток, органов и тканей иммунной системы - Москва, - 2011. – С. 35.

29. Новицкий В.В., Уразова О.И., Филинюк О.В.и др. Показатели апоптоза и пролиферативной активности лимфоцитов у больных туберкулезом легких с множественной лекарственной устойчивостью к *M. tuberculosis* // Мед. иммунология. – 2012. – Т. 14, № 1–2. – С. 119–126.

30. Рабсон А. Основы медицинской иммунологии / А. Рабсон, А. Ройт, П. Делвз. – М.: Мир, 2006. – С. 320.

31. Робинсон М.В., Топоркова Л.Б., Труфакин В.А. Морфология и метаболизм лимфоцитов. – Новосибирск: Наука,1986. – С. 127.

32. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология: Пер. с англ. – М.: Мир, 2000. – 592 с.

33. Савченко А.А., Борисов А.Г. Основы клинической иммунометаболомики. Новосибирск: Наука, 2012. 263 с.

34. Савченко А.А. / Иммунологические нарушения при распространенном гнойном перитоните/ Д.Э. Здзиковетский, А.Г. Борисов// Издательство «Наука» Новосибирск - 2009.

35. Савченко А.А., Сунцова Л.Н. Высокочувствительное определение активности дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови биолюминесцентным методом // Лаб. дело. 1989. №11. С. 23-25.

36. Савченко А.А., Смирнова С.В., Пыцкий В.И. Метаболические особенности лимфоцитов крови у больных истинной аллергией и псевдоаллергией // Аллергология и иммунология. – 2002. – Т.3, № 1. – С.180–187.

37. Сидорова Е.В. / В-1 лимфоциты. Происхождение, дифференцировка, функции // Успехи современной биологии. –2009.–Т. 129, № 1.–С. 27–38.
38. Тюлькова Н.А., Антонова Э.В. НАД(Ф)Н-реагент для биолюминесцентного анализа. – Красноярск: ИБФ, 1991. – С. 18.
39. Уразова О.И., Новицкий В.В., Помогаева А.П. и др. Структурно-метаболический статус мононуклеаров периферической крови при инфекционном мононуклеозе // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2001. – Т.131, № 5. – С.571–573.
40. Хайдуков С.В., Зурочка А.В., ТоголянАрег А., Черешнев В.А. Основные и малые популяции лимфоцитов периферической крови человека и их нормативные значения (методом многоцветного цитометрического анализа) // Мед. иммунология. – 2009. – Т. 11, № 2 – 3. – С. 227–238.
41. Ярилин А.А. Иммунология. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – С. 752.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой



Е.И. Шишацкая

подпись

« 23 »

июня 2017 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

Особенности метаболических механизмов пролиферативной активности
лимфоцитов у больных перитонитом

Руководитель



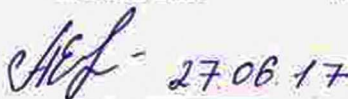
подпись, дата

профессор, д.м.н.

должность, ученая степень

А.А. Савченко

Выпускник



подпись, дата

А.Е. Татаркина