Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Институт последипломного образования

Кафедра кардиологии, функциональной и клинико-лабораторной диагностики ИПО

РЕФЕРАТ

на тему: «Современная оценка воспаления через клетки крови»

Выполнил: врач-ординатор

Сарыглар С. А.

Проверил: Бабушкин В. А.

Красноярск

2023г.

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

[**Введение** 3](file:///C%3A%5CUsers%5C1St%5CDownloads%5C%D0%9C%D0%BE%D0%BD%D0%BE%D1%86%D0%B8%D1%82%D1%8B.docx#_Toc123164286)

[**С-реактивный белок** 3](file:///C%3A%5CUsers%5C1St%5CDownloads%5C%D0%9C%D0%BE%D0%BD%D0%BE%D1%86%D0%B8%D1%82%D1%8B.docx#_Toc123164287)

[**Скорость оседания эритроцитов** 4](file:///C%3A%5CUsers%5C1St%5CDownloads%5C%D0%9C%D0%BE%D0%BD%D0%BE%D1%86%D0%B8%D1%82%D1%8B.docx#_Toc123164289)

[**Цитокины** 6](file:///C%3A%5CUsers%5C1St%5CDownloads%5C%D0%9C%D0%BE%D0%BD%D0%BE%D1%86%D0%B8%D1%82%D1%8B.docx#_Toc123164289)

[**Селектины и интегрины** 6](file:///C%3A%5CUsers%5C1St%5CDownloads%5C%D0%9C%D0%BE%D0%BD%D0%BE%D1%86%D0%B8%D1%82%D1%8B.docx#_Toc123164289)

[**Система комплемента** 7](file:///C%3A%5CUsers%5C1St%5CDownloads%5C%D0%9C%D0%BE%D0%BD%D0%BE%D1%86%D0%B8%D1%82%D1%8B.docx#_Toc123164289)

[**Пресепсин** 8](file:///C%3A%5CUsers%5C1St%5CDownloads%5C%D0%9C%D0%BE%D0%BD%D0%BE%D1%86%D0%B8%D1%82%D1%8B.docx#_Toc123164289)

[**5-дифф анализаторы** 10](file:///C%3A%5CUsers%5C1St%5CDownloads%5C%D0%9C%D0%BE%D0%BD%D0%BE%D1%86%D0%B8%D1%82%D1%8B.docx#_Toc123164292)

[**Заключение** 14](file:///C%3A%5CUsers%5C1St%5CDownloads%5C%D0%9C%D0%BE%D0%BD%D0%BE%D1%86%D0%B8%D1%82%D1%8B.docx#_Toc123164296)

**Введение**

Воспаление — закономерный компонент механизма развития многих заболеваний. Как правило, оно является первым и одним из основных интегративных звеньев в цепи изменений после воздействия на организм патогенного фактора. Воспаление представляет собой системную, тонко скоординированную ответную реакцию организма на повреждение тканей и органов. Биологическое «предназначение» воспаления (как эволюционно выработанного процесса) заключается в локализации, уничтожении и/или удалении из организма его причины; в ограничении и уменьшении последствий его патогенного влияния в организме, а также — в обеспечении процессов последующей репарации. Важно, что действие повреждающего фактора на организм и развитие в нем воспаления характеризуется закономерным формированием как патогенных, так и адаптивных реакций; сопровождается альтерацией и гибелью клеток, разрушением неклеточных структур в очаге воспаления; расстройством жизнедеятельности организма в целом.

**С-реактивный белок**

Воспаление начинается с развития острофазового ответа, который сопровождается нарастанием в плазме крови концентрации белков острой фазы (БОФ). Продукция данных белков происходит в основном в печени и регулируется цитокинами. К белкам острой фазы воспаления относят С-реактивный белок (СРБ), амилоиды А и P, церулоплазмин, гаптоглобин, альфа-1-кислый гликопротеин, альфа 2-макроглобулин, компоненты комплемента и белки свертывания крови, такие как факторы V и VIII, и фибриноген. Традиционно уровень белков острой фазы измеряют непосредственно в плазме или сыворотке крови и используют в клинической практике для оценки наличия, интенсивности и течения воспалительного процесса или заболевания.

Самый чувствительный и общепризнанный диагностически значимый маркер воспаления для острофазового ответа у человека – СРБ. Синтез печеночного СРБ регулируется провоспалительными цитокинами, включая IL-6, IL-1 и TNF-α, поэтому практически любое неспецифическое повреждение ткани, инфекционный процесс, воспаление или стресс сопровождаются повышением уровня циркулирующего в крови СРБ. С-реактивный белок принадлежит к семейству белков пентраксина и может опсонизировать микроорганизмы, такие как бактерии и грибы, за счет связывания с полисахаридами клеточной стенки, а также облегчает фагоцитоз

Классические методы определения СРБ включают радиальную иммунодиффузию, иммунотурбидиметрию и иммунонефелометрию

**Скорость оседания эритроцитов**

Скорость оседания эритроцитов (СОЭ) – лабораторный анализ, позволяющий оценить скорость разделения крови на плазму и эритроциты.

Суть исследования: эритроциты тяжелее плазмы и лейкоцитов, поэтому под воздействием силы земного притяжения они опускаются на дно пробирки. У здоровых людей мембраны эритроцитов имеют отрицательный заряд и отталкиваются друг от друга, что замедляет скорость оседания. Но во время болезни в крови происходит ряд изменений:

-Увеличивается содержание фибриногена, а также альфа- и гамма-глобулинов и С-реактивного белка. Они скапливаются на поверхности эритроцитов и вызывают их склеивание в виде монетных столбиков;

-Снижается концентрация альбумина, который препятствует склеиванию эритроцитов;

-Нарушается электролитный баланс крови. Это приводит к изменению заряда эритроцитов, из-за чего они перестают отталкиваться.

В результате красные кровяные тельца склеиваются между собой. Скопления тяжелее отдельных эритроцитов, они быстрее опускаются на дно, вследствие чего скорость оседания эритроцитов увеличивается. Выделяют четыре группы заболеваний, вызывающих повышение СОЭ:

1. инфекции

2. злокачественные опухоли

3. ревматологические (системные) заболевания

4. болезни почек

Методы определения СОЭ:

* -По Панченкову. Метод успешно применяется для определения скорости оседания эритроцитов в лабораториях России и стран СНГ. В градуированный на 100 делений капилляр Панченкова набирают до метки «Р» 5% раствор цитрата натрия (антикоагулянт) и переносят его на часовое стекло. Затем в тот же капилляр набирают дважды кровь до метки «К» и оба раза выдувают её на часовое стекло (достигается соотношение крови 4:1). Кровь, тщательно перемешанную с цитратом натрия, вновь набирают в капилляр до метки «К». Капилляр ставят в специальный штатив строго вертикально. СОЭ учитывают через 1 час, при необходимости через 24 часа и выражают в миллиметрах.

-По Вестергерну. Данный метод является международным методом определения СОЭ. Он отличается от метода Панченкова характеристиками используемых пробирок и калибровкой шкалы результатов. Результаты, получаемые этим методом, в области нормальных значений совпадают с результатами, получаемыми методом Панченкова. Но метод Вестергрена более чувствителен к повышению СОЭ, и результаты в зоне повышенных значений СОЭ будут точнее результатов, получаемых методом Панченкова.

Для выполнения определения СОЭ по методу Вестергрена необходима венозная кровь, взятая с цитратом натрия 3,8 % в соотношении 4:1. Также используется венозная кровь, взятая с ЭДТА (1,5 мг/мл) и затем разведённая цитратом натрия или физиологическим раствором в соотношении 4:1. Метод выполняется в специальных пробирках Вестергрена с просветом 2,4—2,5 мм и шкалой, градуированной в 200 мм. СОЭ считывают в мм за 1 час.

**Цитокины**

Одними из широко применяемых маркеров воспаления являются цитокины, которые действуют как молекулярные мессенджеры в координации взаимодействия между различными типами клеток, участвующими в усилении, регуляции и контроле воспалительного процесса. Данные эндогенные полипептидные медиаторы воспаления в основном секретируются фагоцитирующими клетками, NK-клетками, антигенпрезентирующими клетками и лимфоцитами. Цитокины совместно с хемокинами способствуют миграции эффекторных клеток к очагу воспаления путем хемотаксиса, модуляции функции иммунных клеток, стимуляции пролиферации и дифференцировки в очаге воспаления. Исследование цитокинового профиля позволяет оценить тяжесть течения риносинусита . Основными цитокинами, обеспечивающими системную воспалительную реакцию, являются IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, фактор некроза опухоли-α. Величина соотношения провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови пациента свидетельствует об активности и выраженности системного воспаления

**Селектины и интегрины**

Для обеспечения контроля адгезии лейкоцитов к эндотелиальным клеткам во время стадии экссудации необходимы такие молекулы, как селектины и интегрины . Селектины представляют собой углеводные лиганды, экспрессируемые на клеточной поверхности различных клеток: лейкоцитов (L-селектин), эндотелиальных клеток (P-селектин, E-селектин) и тромбоцитов (P-селектин). Селектины и их лиганды активируются при многих воспалительных и аутоиммунных заболеваниях и, следовательно, могут служить маркерами при их диагностике: например, при псориазе, воспалительных заболеваниях кишечника, ревматоидном артрите, системной красной волчанке. Селектины способны опосредовать взаимодействия между лейкоцитами, тромбоцитами и эндотелиальными клетками, в том числе и при опухолевом процессе. Лиганды селектина являются медиаторами адгезии опухолевых клеток и обеспечивают экстравазацию дочерних клеток опухоли, что является прогностически неблагоприятным признаком.

Интегрины представляют собой клеточные рецепторы, взаимодействующие с внеклеточным матриксом и передающие межклеточные сигналы, тем самым запуская механизмы миграции лейкоцитов по сосудистому руслу к местам повреждения и воспаления. Активация интегринов происходит двумя путями: опосредованно селектином или цитокинами/хемокинами. При полной активации интегрины способствуют адгезии иммунных клеток к рецепторам сосудистого эндотелия с последующей миграцией клеток из крови в окружающие ткани .

Экспрессия селектинов и интегринов на клетках изменяется при разрешении острой фазы воспалительного ответа или при переходе в хроническое воспаление. Их лиганды могут быть количественно определены с использованием таких методов, как иммуногистохимическое исследование, проточная цитометрия, микроскопия. Растворимые формы селектинов присутствуют в сыворотке и могут быть оценены с помощью иммуноферментного анализа .

**Система комплемента**

Система комплемента представляет собой сложную сеть белков, участвующих в остром воспалительном ответе и влияющих на высвобождение медиаторов воспаления, хемотаксис, а также увеличивающих сосудистую проницаемость и фагоцитоз за счет опсонизации микроорганизмов. Система комплемента играет ключевую роль в системе врожденного иммунитета, непосредственно уничтожая бактерии с помощью атакующего комплекса порообразующих мембран (MAC), а также способствует развитию воспалительной реакции через производство анафилатоксинов. Активации комплемента способствует комплекс антиген-антитело, запускающий каскад реакцией активации системы комплемента. При аутоиммунных заболеваниях наблюдается образование иммунных комплексов, которое приводит к повреждению тканей организма и активации комплимента. Определение белков системы комплемента используется в качестве маркера воспаления, но более широкое применение данный метод нашел в фармакологии

**Пресепсин**

Ранний индикатор инфекционного процесса, известный как пресепсин (sCD14-ST), был описан в 2005 г. группой японских исследователей и представляет собой подтип растворимого рецептора CD14. CD14 имеет две формы: мембраносвязанный (mCD14) и растворимый (sCD14). Растворимая форма (sCD14) обнаруживается в плазме и продуцируется в результате распада mCD14. Растворимый подтип CD14 расщепляется катепсином D и другими протеазами в плазме с образованием пресепсина (sCD14-ST). CD14 является корецептором, который находится на поверхности моноцитов/макрофагов и является членом Toll-подобного рецептора 4, который активируется липополисахаридом стенок бактерий . Вследствие стимуляции рецептора происходит высвобождение провоспалительных цитокинов и запускаются механизмы, ответственные за иммунный ответ, высвобождаются растворимые подтипы CD14 (sCD14-ST). Концентрация пресепсина в крови повышается в ответ на бактериальные инфекции и снижается при эффективном лечении . Уровень пресепсина в крови в норме составляет примерно 290 пг/мл. Он исследуется с помощью высокочувствительной автоматизированной системы PATHFAST путем хемилюминесцентного иммуноферментного анализа, результаты по которому получают в течение 17 мин. Уровень пресепсина можно рассматривать в качестве индикатора для мониторинга антибактериальной терапии. Повышенная концентрация пресепсина в плазме была отмечена у пациентов с неадекватной антибактериальной терапией и положительным посевом крови на бактерии, а также если инфекция была вызвана бактериями с множественной лекарственной устойчивостью. Таким образом, пресепсин обладает высокой чувствительностью и специфичностью в диагностике сепсиса и может быть полезным и ценным биомаркером в его ранней диагностике.

Однако он не может быть использован в качестве единственного маркера в диагностике сепсиса. Способность пресепсина прогнозировать тяжесть бактериальных инфекций и простое определение в крови в отделениях интенсивной терапии и неотложной помощи, в т. ч. и в детской практике, позволяет широко применять данный маркер. В особенности было исследовано применение пресепсина в диагностике сепсиса у недоношенных новорожденных, пациентов с онкологией и детей, находящихся в критическом состоянии. Преимуществом пресепсина над СРБ является его независимость от гестационного возраста ребенка, более высокая чувствительность в диагностике неонатального сепсиса и более раннее повышение в крови . На концентрацию пресепсина в крови влияют: возраст (новорожденные или пожилые люди), почечная дисфункция, бактериемия и гемофагоцитарный синдром. Недостаточно исследовано влияние стероидов на уровень пресепсина, не изучены пороговые значения для выявления разных типов инфекций в разных группах пациентов.

**5-дифф анализаторы**

Основным отличием гематологических анализаторов 5-дифф от анализаторов 3-дифф является их способность определять все 5 субпопуляций лейкоцитов: лимфоциты (Lym), моноциты (Mon), нейтрофилы (Neu), базофилы (Bas) и эозинофилы (Eos), а также их процентное содержание Lym%, Mon%, Neu%, Bas% и Eos%. Импедансный метод подсчета, известный также как счетчик Коултера, применяемый в анализаторах 3-дифф, не в состоянии различить нейтрофилы, базофилы и эозинофилы, по этому в анализаторах 5-дифф применяется иной метод дифференцировки клеток. Он основан на принципе дифракции лазерного излучения на клетках лейкоцитов и дальнейшем анализе рассеянного излучения. «Средние» лейкоциты не отличаются по размеру настолько что бы различать их импедансным методом, но имеют различную внутреннюю структуру и по-разному взаимодействуют с красителями. А метод детектирования дифракционной картины оказывается чувствительным ко внутренней структуре клеток. Таким образом эритроциты и тромбоциты подсчитываются счетчиком Коултера, а лейкоциты отдельным лазерным блоком.

Высокотехнологические гематологические анализаторы способны осуществлять дифференцированный счет лейкоцитов по 5-ти (5Diff) основным популяциям, используя различные принципы дифференцирования клеток: нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, моноциты и лимфоциты, оценивать наличие незрелых гранулоцитов, анализировать ретикулоциты и их субпопуляции, проводить оценку стволовых гемопоэтических клеток и субпопуляций лимфоцитов. Многочисленные функции современных гематологических анализаторов стали возможны, благодаря развитию новых технологий, которые отличаются у разных фирм-производителей.

Так, в анализаторах фирмы Bekman-Coulter (LH 500, LH750) (США - Франция) используется трехмерный анализ дифференцировки лейкоцитов (VCS-технология), который включает в себя одновременный компьютерный анализ клеток по объему, электропроводности и дисперсии лазерного света.

Полученные по трем каналам данные с помощью электроники комбинируются и анализируются, в результате чего происходит распределение клеток по дифференцировочным кластерам и, таким образом, лейкоциты разделяются на пять основных популяций: лимфоциты, моноциты, нейтрофилы, эозинофилы и базофилы (рис. 16 - не приводится). Результатом отображения объемного графика на плоскости является лейкоцитарная скатерограмма, на которой каждый тип клеток имеет свою зону расположения.

В анализаторах серии Cell-Dyn для дифференцировки лейкоцитов применяется технология MAPSS - Multi Angle Polarized Scatter Separation - мультипараметрическая система лазерного светорассеивания - регистрация интенсивности рассеивания клетками поляризованного лазерного луча под разными углами. Этот метод заключается в компьютерном анализе дисперсии лазерного счета клетками крови. Рассеивание клеткой поляризованного лазерного луча под разными углами дает сведения о таких ее свойствах, как:

- размер клеток - для чего оценивается прохождение поляризованного лазерного луча под малым углом рассеивания (близким к 0 град.);

- структура и степень сложности клеток - оценивается по анализу рассеивания поляризованных лазерных лучей, направленных под углом до 7 град.;

- ядерно-цитоплазматическое соотношение - оценивается по анализу рассеивания поляризованных лазерных лучей, направленных под углом до 10 град.;

- оценка формы клеточного ядра - осуществляется благодаря анализу светорассеивания поляризованных лазерных лучей под углом 90 град.;

- для оценки клеточной зернистости и дифференцировки эозинофилов используется оценка светорассеивания деполяризованного луча под углом в 90 град.

В приборах серии Technicon, ADVIA120, 2120, Pentra DX 120 разработан принцип жидкостной цитохимии (измерение активности пероксидазы в лейкоцитах), который в сочетании с другими методами (кондуктометрический, гидродинамическое фокусирование, оптическая абсорбция) позволяет проводить дифференцировку лейкоцитов. Использование пероксидазной реакции основано на различной ее активности в лейкоцитах. Так, эозинофилы и нейтрофилы имеют интенсивную пероксидазную активность, моноциты - слабую, в лимфоцитах она не выявляется.

Проточная цитохимическая техника включает регистрацию рассеянного и поглощенного светового луча. В лейкоцитарном канале после лизиса эритроцитов и стабилизации лейкоцитов происходит цитохимическая реакция, далее лейкоциты дифференцируются по двум признакам: размеру клеток, определяемому методом рассеивания лазерного луча, и пероксидазной активности - по поглощению клеткой светового потока. Дифференцировка базофилов от других гранулоцитов проводится в базоканале. Цитоплазма всех лейкоцитов за исключением базофилов подвергается лизису после обработки пробы специфическим лизатом. Затем в канале осуществляется измерение дисперсии лазерного света под углами 2 град. - 3 град. и 5 град. - 15 град., что позволяет различить клетки в зависимости от формы ядер.

Сравнивая информацию, получаемую с Perox- и Baso-каналов, компьютер осуществляет дифференцировку лейкоцитов на 5 основных популяций, а также сигнализирует в виде флагов о присутствии в крови активированных лимфоцитов, незрелых гранулоцитов, бластов, эритробластов.

В гематологических анализаторах серии XT и ХЕ фирмы Sysmex применяется метод проточной цитофлюориметрии с использованием флюоресцентного красителя полиметина. Этот флюоресцентный краситель связывается с ДНК и РНК неизмененных клеток, что позволяет использовать его как для дифференцировки лейкоцитов по 5-ти параметрам (нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, моноциты и лимфоциты), так и для подсчета ретикулоцитов.

Анализ клеток происходит в проточной кювете при пересечении луча лазера длиной 633 нм (рис. 21 - не приводится). После контакта лазерного луча с окрашенной клеткой происходит рассеивание последнего под большим и малым углами и возбуждение флюоресцентного красителя. Данные сигналы улавливаются фотоумножителями и регистрируются в виде трех параметров (рис. 22 - не приводится):

1. Светорассеивание под малым углом (FSC) - отклонение лазерного луча под малым (до 10 град.) углом, которое зависит от размера (объема, только при условии сферической формы частицы) и формы клетки;

2. Боковое светорассеивание (SSC) - рассеивание под углом до 90 град. зависит от рефрактерного индекса (или плотности) клетки и характеризует сложность внутриклеточных структур;

3. Детекция специфического флюоресцентного сигнала (SFL), которая регистрируется также как боковое светорассеивание под углом 90 град. и позволяет судить о содержании РНК/ДНК в клетках.

На основании полученных сигналов все клетки распределяются по соответствующим кластерам (зонам) в соответствии с их размером, структурой и количеством ДНК (рис. 23 - не приводится). Таким образом, происходит дифференцировка лейкоцитов на 4 популяции: лимфоциты, моноциты, эозинофилы и нейтрофилы вместе с базофилами (рис. 24 - не приводится).

Разделение нейтрофилов и базофилов происходит в базоканале, где используется метод специфического химического лизиса, основанный на предварительной обработке лейкоцитов реактивом, осуществляющим лизис всех клеток, за исключением базофилов (рис. 25 - не приводится), с последующим дискриминантным анализом всех элементов по размеру и сложности структуры и количеству ДНК (рис. 26 - не приводится).

Кроме того, приборы оборудованы каналом для выделения незрелых гранулоцитов и атипичных лимфоцитов.

Таким образом, использование приборов с полным дифференцированным подсчетом лейкоцитов (5Diff) позволяет повысить точность дифференциального подсчета лейкоцитов, провести скрининг нормы и патологии, динамический контроль за лейкоцитарной формулой и резко сократить ручной подсчет лейкоцитарной формулы, оставляя примерно до 15-20% образцов крови для световой микроскопии.

**Заключение**

Воспаление является патологическим процессом, направленным на защиту организма при воздействии различных повреждающих факторов, в том числе лежащих в основе многих заболеваний. В качестве маркеров воспаления в первую очередь выступают белки острой фазы, такие как C-реактивный белок, фибриноген; медиаторы воспаления, такие как цитокины; а также рецепторы клеточной поверхности и клеточной адгезии, такие как селектины и интегрины. При этом незаменимыми биомаркерами воспаления по-прежнему остаются и клетки крови, которые активируются в острой фазе воспаления и непосредственно продуцируют и высвобождают ряд растворимых медиаторов, стимулирующих и регулирующих воспалительную реакцию. В связи с этим понимание механизмов развития воспаления крайне необходимо для его своевременно выявления и контроля, а также диагностики, лечения и профилактики соответствующих заболеваний.

Однако все широко применяемые в современной клинической практике маркеры воспаления являются неспецифичными, они позволяют установить факт наличия воспаления, но не выявить его этиологию