В.П. ЧЕРНИШОВ¹, СТАМБОЛІ Л.В.¹,
ОСИПЧУК Д.В.¹, ЧЕРНИШОВА Л.І.², ДОНСЬКОЇ Б.В.¹
¹ДУ “ІПАГ НАМН України”, лабораторія імунології, м. Київ;
²НМАПО ім. П.Л. Шупика,
кафедра дитячих інфекційних хвороб та дитячої імунології, м. Київ
dariia_osypchuk@ukr.net

Лабораторна діагностика хронічної гранульоматозної хвороби: порівняння двох методів

Нейтрофіли – високоспеціалізовані клітини природної ланки імунітету, первинна функція яких полягає в знищенні патогенів; це перші імунні клітини, які мігрують до місця інфекції. В місці інфекції нейтрофіли швидко ініціюють мікробіцидні функції – продукцію антимікробних продуктів і прозапальних цитокінів, що сприяють затриманню розвитку інфекції [6]. Важливим елементом бактерицидної функції гранулоцитів є продукція ними активних форм кисню (АФК). Цей процес здійснюється завдяки ферменту – нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат (НАДФ)-оксидази. Унаслідок подальших реакцій із АФК утворюється низка токсичних сполук, які забезпечують руйнування патогенів в утворених фагосомах [7].

Порушення функцій ферменту НАДФ-оксидази спричинює важкі бактеріальні та грибові інфекції у хворих із хронічною гранульоматозною хворобою. Хронічна гранульоматозна хвороба (ХГХ) – це первинний імунodefіцит, в основі якого лежить один із 5 генетичних дефектів у генах, що кодують НАДФ-оксидазу. Основними проявами хронічної гранульоматозної хвороби є важкі рецидивні бактеріальні та грибові інфекції, утворення гранульом. Єдиний метод лікування цієї патології – трансплантація стовбурових клітин кісткового мозку [1].

Виявлення дефекту в системі НАДФН-оксидази нейтрофілів – важлива частина в діагностиці ХГХ. Тест відновлення нейтрофілами нітросинього тетразолію (НСТ-тест) вважається традиційним лабораторним тестом для діагностики ХГХ. Тест ґрунтується на відновленні нейтрофілами барвника НСТ до нерозчинного формазану. Ця реакція відбувається за умови нормального функціонування клітинної НАДФ-оксидази та продукції АФК. Нерозчинний формазан відкладається в клітинах у вигляді темно-синіх гранул та візуально визначається світловою мікроскопією.

Альтернативою НСТ-тесту для дослідження функціональної активності НАДФ-оксидази гранулоцитів є тест із дигідрородаміном-123. Дигідрородамін-123 – це барвник, який, взаємодіючи з пероксинітрином (проміжна сполука при кисневому вибуху) клітин, окиснюється до флюорохрому – родаміну-123, який зв’язується з клітинною мембраною. Клітини, забарвлені родаміном-123, визначаються за допомогою проточної цитофлюорометрії [5].

Мета дослідження. Порівняти результати дослідження продукції АФК гранулоцитами двома методами – НСТ-тестом і тестом із ДГР-123 – у дітей із інвазивними бактеріальними інфекціями та дітей із хронічною гранульоматозною хворобою.

Матеріали й методи дослідження. Проведено дослідження кисневого вибуху гранулоцитів двома методами. До 1-ї групи увійшли діти з інвазивними бактеріальними інфекціями ($n = 26$) віком від 4 до 16 років; до 2-ї групи – діти з хронічною гранульоматозною хворобою ($n = 4$) віком 6–14 років. Діагноз визначено на основі клінічних і лабораторних даних. У двох дітей діагноз підтверджений генетично (одна дівчинка з автосомно-рецесивною формою успадкування, один хлопчик із Х-зчепленою ХГХ), у двох інших дітей – генетичне дослідження в роботі. До 3-ї групи віднесено здорових дітей віком 3–13 років ($n=10$), у яких не зафіксовано гострих, рекурентних або хронічних захворювань та які протягом трьох місяців не хворіли на інфекційні захворювання, а також не отримували лікування антибактеріальними та імуномодуючими препаратами з будь-якої причини. На обстеження дітей та використання результатів дослідження отримано інформовану згоду батьків.

Відсоток клітин, які продукують реактивні кисневі сполуки, визначали двома методами: НСТ-тест і тест із ДГР-123.

Для проведення НСТ-тесту на два знежирені предметні скельця наносили мікропіпеткою по 0,02 мл гепаринізованої крові та 0,02 мл 0,15% розчину НСТ. До суміші на одному зі скельць мікропіпеткою додавали 0,02 мл ліпополісахариду (20 мкг/мл) – стимульований варіант, на другому – 0,02 мл розчинника – ізотонічний розчин (спонтанний варіант) фосфатно-сольового буфера, рН 7,2. Каплі обережно перемішували скляною паличкою і інкубували 30 хв при 37° С у вологих камерах. Після інкубації робили мазки, висувували на повітрі, фіксували 10 хв метиловим спиртом і дофарбовували 2 % розчином метилового зеленого на ацетатному буфері, рН 5,0. Під масляною імерсією мікроскопа підраховували 200 нейтрофілів і визначали відсоток НСТ-позитивних клітин, які містили синьо-фіолетові гранули формагану.

Для виконання тесту з ДГР-123 гепаринізовану кров (три зразки об'ємом по 100 мкл) охолоджували на льодяній бані протягом 10 хв. До одного зі зразків додавали фізіологічний розчин, до двох інших зразків – ФМА (500 нг/мл) (Sigma Aldrich, США). Зразки інкубували в тепловій бані (рухомій) протягом 10 хв. Після інкубації до кожного зразка додавали ДГР-123 (10 мкмоль) (Sigma Aldrich, США), ретельно перемішували й ставили на інкубацію в тепловій бані (10 хв). Після інкубації до кожного зразка додавали 500 мкл лізуючого розчину (Sigma Aldrich, США) та перемішували. Інкубували 15 хв за кімнатної температури. Після інкубації до кожного зразка додавали 500 мкл дистильованої води й ретельно перемішували. Зразки відмивали в 3 мл розчину Cell Wash (Sigma Aldrich, США) (5 хв, 1500 g, 4° С). Після центрифугування зливали надосад, перемішували на Vortex і аналізували на приладі FACS Scan (BD). Гранулоцити виокремлювали за FSC/SSC параметрами. Для аналізу брали 10 000 подій. Гранулоцити, які продукували активні форми кисню та окиснювали ДГР-123 до флюоресцентного родаміну 123, визначали як позитивні за FL-1 віссю.

Статистичне опрацювання результатів проводили за допомогою програми GraphPad Prism 6.0.

Результати дослідження та їх обговорення. Дослідження відсотка клітини, які продукують АФК в неактивованому стані, за допомогою НСТ-тесту (рис. 1) показало, що в групі дітей з інвазивними бактеріальними інфекціями середній відсоток клітин, які продукували АФК, становив $18,5 \pm 5,5$ (5–30%). У контрольній групі середній відсоток клітин – продуцентів АФК становив $15,9 \pm 4,5$ (8–28 %). Між групами не було статистичної достовірності ($p = 0,15$).

Рис. 1. Відсоток гранулоцитів, які продукують активні форми кисню в неактивованому стані, визначений за допомогою НСТ-тесту.

У групі дітей з ХГХ середній відсоток клітин – продуцентів АФК був значно нижчим – $6,5 \pm 2,8$ (4–12 %). Цей показник достовірно нижчий порівняно з показниками контрольної групи ($p < 0,05$) та групи дітей з інвазивними бактеріальними інфекціями ($p < 0,05$).

Дослідження відсотка родамінпозитивних клітин (продуцентів АФК) з використанням ДГР-123 (рис. 2), показало результати, подібні до результатів НСТ-тесту. Середній відсоток клітин – продуцентів АФК був найнижчим у групі дітей із ХГХ – $1,8 \pm 0,6$ (1,2–3 %). Цей показник достовірно відрізнявся від аналогічних показників у контрольній групі ($4,9 \pm 2,6$ % (1,9–9 %), $p < 0,05$) та групі дітей з інвазивними бактеріальними інфекціями ($27,5 \pm 6$ % (5–42 %), $p < 0,05$).

Рис. 2. Відсоток гранулоцитів, які продукують активні форми кисню в неактивованому стані, визначений за допомогою тесту з ДГР-123.

Таким чином, як НСТ-тест, так і тест із ДГР-123 демонструють достовірно нижчий відсоток клітин – продуцентів АФК у неактивованому стані в групі дітей із ХГХ.

Дослідження відсотка клітин, які продукують АФК в активованому стані з використанням НСТ-тесту (рис. 3), показало, що діти з ХГХ мали нижчий відсоток клітин, які містили синьо-фіолетові гранули формазану при стимуляції – $12,3 \pm 3,9$, цей показник був у межах 8–20 %. У контрольній групі дітей і в групі дітей з інвазивними бактеріальними інфекціями середній відсоток клітин-продуцентів АФК був $26,8 \pm 4,2$ (17–38 %) та $27,5 \pm 6$ (5–42 %) відповідно. Ці показники були достовірно вищими порівняно з показником у групі дітей із ХГХ ($p < 0,01$). Хоча відсоток клітин – продуцентів АФК у групі дітей із ХГХ достовірно відрізнявся від показників у інших групах, із рис. 3 бачимо, що шість зразків із групи дітей з інвазивними бактеріальними захворюваннями та два зразки з контрольної групи дітей були подібні до показників дітей із ХГХ, в межах 8–20 %.

Рис. 3. Відсоток гранулоцитів, які продукують активні форми кисню в активованому стані, визначений за допомогою НСТ-тесту.

За даними [2–4, 9], нормальні або знижені показники стимульованого НСТ-тесту за наявності бактеріальної інфекції можуть спостерігатись у разі локалізованих інфекцій, застосування кортикостероїдів, імуносупресантів, антибіотиків, при туберкульозі, агамаглобулінемії, системному червоному вовчаку, станах, для яких характерна наявність імунних комплексів, хронічній мієлоїдній лейкемії, діабеті тощо.

Такий широкий спектр станів, які призводять до знижених показників стимульованого НСТ-тесту, не дає змоги провести диференціальну діагностику хронічної гранульоматозної хвороби з іншими патологіями.

На рис. 4 відображено відсоток родамінпозитивних гранулоцитів, які продукували АФК в активованому стані, визначених за допомогою тесту з ДГР-123. Як бачимо, в групі дітей із ХГХ цей показник був значно нижчим і дорівнював $3,1 \pm 0,1\%$ (2,9–3,3 %). Відсоток клітин – продуцентів АФК в групі дітей з інвазивними бактеріальними інфекціями ($97,8 \pm 2,6\%$) та в контрольній групі ($97,8 \pm 2,6\%$) був достовірно вищий ($p < 0,01$). У контрольній групі та в групі дітей з інвазивними бактеріальними інфекціями цей показник становив

90–99,9 %. Важливо зазначити відсутність “проміжних” показників відсотка активованих клітин – продуцентів АФК, що дає змогу чітко визначити межі норми.

Рис. 4. Відсоток гранулоцитів, які продукують активні форми кисню в активованому стані, визначений за допомогою тесту з ДГР-123.

Відсоток активованих клітин – продуцентів АФК в тесті з ДГР-123 у здорових індивідів має бути не менше 90–100 %. Проте кожна лабораторія мусить провести низку досліджень і визначити власний внутрішньолaboratorний контроль з урахуванням laboratorного обладнання та чинників, що впливають на якість досліджень. До чинників впливу на результати тесту з ДГР-123 відносять термін зберігання зразка, тип антикоагулянту, який використовували під час взяття крові, температурний режим зберігання крові та застосування імуносупресивної терапії, що може знижувати активність гранулоцитів. За деякими джерелами [8] та досвідом нашої лабораторії, використання таких антикоагулянтів, як ЕДТА і цитрат натрію, призводить до суттєвого зниження показників тесту з ДГР-123. Щоб уникнути хибно позитивних результатів під час виконання тесту з ДГР-123, потрібно використовувати лише гепаринізовану кров.

Рис. 5. Результат тесту з ДГР-123 контрольного зразка у вигляді гістограми: а – гранулоцити без додавання активатора; б – гранулоцити після інкубації з ФМА.

Ще однією важливою перевагою тесту з ДГР-123 є те, що результати тесту подаються у вигляді чітких гістограм (рис. 5, 6), які значно зменшують суб'єктивність інтерпретації результатів.

Рис. 6. Результат тесту з ДГР-123 пацієнта з хронічною гранульоматозною хворобою у вигляді гістограм: *а* – гранулоцити без додавання активатора; *б* – гранулоцити після інкубації з ФМА.

Висновки. Результати порівняння двох методів демонструють, що як НСТ-тест, так і тест із ДГР-123 відображають знижену продукцію АФК у хворих на ХГХ – середні значення відсотка клітин-продуцентів у групі дітей з ХГХ достовірно нижчі порівняно з іншими групами. Проте тест із ДГР-123 більш чутливий і достовірний у діагностиці цієї патології. Принцип тесту з ДГР-123 подібний до НСТ-тесту – гранулоцити активують і, завдяки барвникам, які відображають активність кисневого вибуху, оцінюють функціональний стан гранулоцитів. Водночас тест із ДГР-123 має низку переваг над НСТ-тестом. Процедура виконання тесту з ДГР-123 швидша – час проведення тесту й аналізу результатів займає не більше години. У тесті з ДГР-123 на проточному цитофлюориметрі для аналізу береться не менше 10 000 клітин, порівняно з НСТ-тестом (лише 200 клітин). Якісний НСТ-тест вимагає професійного досвіду та навичок для візуального визначення та підрахунку активованих клітин, тоді як результати тесту з ДГР-123 подаються у вигляді гістограм, що дає змогу об'єктивно оцінити результати. Таким чином, тест із ДГР-123 є більш якісним та надійним методом лабораторної діагностики хронічної гранульоматозної хвороби.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Чернишова Л.І. Дитяча імунологія / Л.І. Чернишова, А.П. Волоха, Л.В. Костюченко [та ін.]. – К. : ВСВ “Медицина”, 2013. – 720 с. (*Chernyshova L. Pediatric Immunology / L. Chernyshova, A. Volokha, L. Kostychenko [et al.] – K. : VSV “Medicine”, 2013. – 720 p.*)
2. Bjorksten B. The influence of technical factors on the NBT test / B. Bjorksten // *Scand. J. Haematol.* – 1974. – Vol. 12. – P. 46.
3. Bjorksten B. The nitroblue tetrazolium (NBT) test and white blood cell count in acute throat infections / B. Bjorksten, T. Ekstrand, L. Gothefors [et al.] // *Scand. J. Infect. Dis.* – 1975. – Vol. 7. – P. 45.
4. Chretien J.H. NBT test and steroid therapy / J.H. Chretien, V.F. Garagusi // *Lancet.* – 1972. – Vol. 300. – P. 653.
5. Jirapongsananuruk O. Diagnostic paradigm for evaluation of male patients with chronic granulomatous disease, based on the dihydrorhodamine 123 assay / O. Jirapongsananuruk, H.L. Malech, D.B. Kuhns [et al.] // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2003. – Vol. 111. – P. 374–379.
6. Kobayashi S.D. Neutrophils in the innate immune response / S.D. Kobayashi, J.M. Voyich, C. Burlak [et al.] // *Arch. Immunol. Ther. Exp.* – 2005. – Vol. 53. – P. 505–517.
7. Kolaczowska E. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation / E. Kolaczowska, P. Kubes // *Nat. Rev. Immunol.* – 2013. – Vol. 13. – P. 159–175.
8. Prince H.E. Influence of specimen age and anticoagulant on flow cytometric evaluation of granulocyte oxidative burst generation / H.E. Prince M. Lapé-Nixon // *J. Immunol. Methods.* – 1995. – Vol. 15. – P. 129–138.
9. Segal A.W. Re-evaluation of nitroblue tetrazolium test / A.W. Segal, S.F. Trustey, A.J. Levi // *Lancet.* – 1973. – Vol. 302. – P. 879–883.

Laboratory Diagnostic of Chronic Granulomatous Disease: Comparison of Two Methods

V. CHERNYSHOV¹, L. STAMBOLI¹, D. OSYPCCHUK¹,
L. CHERNYSHOVA², B. DONSKOY¹

¹Laboratory of Immunology, Institute of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology,
National Academy of Medical Sciences of Ukraine;

²Department of Children Infectious Diseases and Children's Immunology,
Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education

Granulocytes form the first and most prominent line of cellular defense against invading microorganisms. Active recruitment of granulocytes to the sites of infection is fundamentally important for the innate immune system. Phagocytes bind to and ingest microorganisms by a process known as phagocytosis, which typically triggers the production of reactive oxygen species (ROS) and the fusion of cytoplasmic granules with pathogen-containing vacuoles. The process of ROS production is dependent on multicomponent enzyme – nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP)-oxidase. As a result of further reactions with ROS, a number of toxic compounds that ensure destruction of pathogens in the formed phagosome are produced.

Chronic granulomatous disease (CGD) is a group of five genetic disorders of the phagocyte NADP-oxidase complex generating ROS in response to physiological stimuli such as the phagocytosis of microbes. CGD leads to recurrent life-threatening opportunistic infections and uncontrolled inflammation, often accompanied by granuloma formation. A provisional diagnosis of CGD is made by a DHR assay using flow cytometry or by nitroblue tetrazolium (NBT) using light microscopy. DHR (dihydrorhodamine-1, 2, 3) freely enters the phagocytes and is oxidised intracellularly to rhodamine-1, 2, 3 by diffusible H₂O₂ after phagocyte stimulation.

In our study we have compared measurement of neutrophils (NADPH)-oxidase complex activity by two methods – NBT-test and DHR assay in a group of healthy children, children with CGD (three genetically confirmed patients) and the group of children with invasive bacterial infections.

The data shows that both methods – NBT-test and DHR-123 assay – reveal the reduced production of ROS in patients with; however, the test DHR-123 assay is more sensitive and reliable in the diagnosis of this pathology. DHR-123 assay make it possible to clearly distinguish patients with CGD, while NBT-test demonstrate lower production of ROS not only in patients with CGD, but in children with invasive bacterial infections as well. Such factors as antibiotics and immunosuppressants usage, localized infections, tuberculosis, autoimmune diseases that can lead to decreased NBT-results, that make this method unsuitable for differential diagnosis of CGD.

Despite the DHR-123 assay and NBT-test have similar principle – activated granulocytes that produces ROS, visualized with the dyes – that reflect the activity of the NADP oxidase and functional status of granulocytes – the DHR-123 assay shows several more advantages over NBT-test. The DHR-123 assay is faster – it takes 40–50 min to get results, while NBT-test takes at least 60–80 min. Also, the test with DHR-123 is a flow cytometry method that allow to analyze a greater number of cells – at least 10 000 cells, compared to NBT-test, where the analysis takes only 200 cells. One more important aspect in comparison of these two methods is evaluation of results. NBT-test is a light microscopy method, and it requires professional experience and strong skills to visually identify and count the activated cells. Often, due to subjective evaluation, we can get false-negative results. While the results of DHR-123 assay display as histograms or dotplots, allowing objectively evaluate the results.

Thus, the DHR-123 assay have multiple advantages over NBT-test in the laboratory diagnosis of chronic granulomatous disease. DHR-123 assay is a high quality and reliable method and it should be implement in screening laboratory practice for diagnosis of chronic granulomatous disease.

Key words: chronic granulomatous disease, NBT-test, DHR-123 assay.