



**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ**

**Медицински факултет**

**Катедра по медицинска физика и биофизика**

---



**Благовест Георгиев Бечев**

**РАЗВИТИЕ И ПРИЛОЖЕНИЕ НА МЕТОДИТЕ ЗА КЛЕТЪЧНА  
ХЕМИЛУМИНЕСЦЕНЦИЯ ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ ФУНКЦИОНАЛНОТО  
СЪСТОЯНИЕ НА ФАГОЦИТИРАЩИ КЛЕТКИ В БИОЛОГИЧНИ ТЕЧНОСТИ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**за присъждане на образователна и научна степен „ДОКТОР”**

**научна специалност „Биофизика”**

**Научен ръководител: проф. Трайко Т. Трайков, дх**

**София, 2018 г**

Дисертационният труд съдържа 118 страници и е онагледен с 37 фигури и 10 таблици. Библиографският списък съдържа 111 литературни източници, от които 10 на кирилица и 101 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за публична защита от Катедрения съвет на Катедрата по медицинска физика и биофизика при Медицински факултет на Медицински университет – София на 10 юли 2018 (Протокол N 45).

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 07.11.2018 г. от 16.00 ч. в Аудитория № 4, на 4 етаж на Медицински факултет, Медицински Университет - София, ул. „Здраве” 2, съобразно Заповед на ректора № РК 36-1266/24.07.2018 г. пред научно жури в състав:

**Председател:**

1. **Проф. Трайко Тодоров Трайков, дх** – катедра медицинска физика и биофизика, МФ, МУ-София (становище).

**Членове:**

2. **Проф. д-р Недка Любомирова Трифонова, дм** - катедра по биология на Медицински факултет при МУ – София (рецензия).

3. **Проф. Маргарита Любомирова Александрова, дбн** - Медицински университет – Плевен (рецензия).

4. **Доц. Марин Иванов Маринов, дх** - външен член за МУ – София (становище).

5. **Доц. д-р Паулина Цветкова Николова (Глоговска), дм** - Факултет по фармация на Медицински университет – Плевен (становище).

Материалите по защитата са публикувани на интернет страницата на МУ- София и са на разположение на интересуващите се в Катедрата по медицинска физика и биофизика, МФ, МУ –София, ул. „Здраве” 2.

## СЪДЪРЖАНИЕ

<b>I. ВЪВЕДЕНИЕ.....</b>	<b>7</b>
<b>II. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ .....</b>	<b>10</b>
<b>1. Събиране и съхранение на биологични материали .....</b>	<b>10</b>
<b>1.1 Кръв. ....</b>	<b>10</b>
<b>1.2 Пунктатна течност. ....</b>	<b>10</b>
<b>2. Пациенти и диагностични категории .....</b>	<b>10</b>
<b>3. Работна карта на пациент с плеврален излив.....</b>	<b>11</b>
<b>4. Реагенти.....</b>	<b>13</b>
<b>4.1 Zymosan .....</b>	<b>13</b>
<b>4.2 Луминол. ....</b>	<b>14</b>
<b>4.3 Буфер.....</b>	<b>14</b>
<b>5. Изолация на ПМН.....</b>	<b>14</b>
<b>6. Изолация на RBC. ....</b>	<b>15</b>
<b>7. Определянето на общия брой левкоцити и RBC в кръв и в пунктат .....</b>	<b>15</b>
<b>8. Диференциално броене на елементи от белия кръвен ред в материали от плеврални пункции.....</b>	<b>15</b>
<b>9. Определяне на типа излив според критериите на Light .....</b>	<b>16</b>
<b>10. Хемилуминесцентни измервания и оценка функционалното състояние на ПМН. .</b>	<b>16</b>
<b>10.1 Хемилуминесцентни измервания.....</b>	<b>16</b>
<b>10.2 Обработка на получените „сурови“ данни за оценка функционалното състояние на ПМН. ....</b>	<b>16</b>
<b>10.2.1 Първична обработка. ....</b>	<b>16</b>
<b>10.2.2 Оценка функционалното състояние на ПМН.....</b>	<b>16</b>
<b>10.2.2.1 На база изчисляване на стандартни ХЛ параметри. ....</b>	<b>16</b>
<b>10.2.2.2 На база изчисляване параметри на компонентен модел на кинетичните ХЛ криви.....</b>	<b>17</b>
<b>11. Хемилуминесцентен тест за оценка активността на ПМН в пунктата и кръвта на пациенти. ....</b>	<b>20</b>
<b>12. Статистически анализ .....</b>	<b>20</b>
<b>III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ .....</b>	<b>21</b>

<b>IV. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ</b> .....	<b>22</b>
1. Създаване на апарат за интегрални и спектрални хемилуминесцентни измервания. .....	23
1.1. Изисквания към луминометъра, необходими за постигане целта на работата	23
1.2. Принципна схема на устройството на апарата.....	23
1.3. Софтуерно осигуряване.....	25
1.3.1. Избор на режим на измерване и състав на пробата .....	25
1.3.2. Управление на системата за сканиране, възприемане и запис на "суровите" данни .....	25
1.3.3. Специализиран софтуер за ХЛ измервания (обработка след приключване на измерванията).....	25
2. Усъвършенстване методиката за целокръвни хемилуминесцентни изследвания...	26
2.1. Предпоставки за усъвършенствуването .....	26
2.2. Влияние на концентрацията на ПМН в общият ХЛ отговор .....	27
2.3. Влияние на RBC в общият ХЛ отговор.....	28
2.4. Съвместно влияние на ПМН и RBC върху ХЛ отговор .....	30
2.5. Приложение и предимства на усъвършенстваната методика за целокръвни ХЛ изследвания .....	32
3. Изследване влиянието на амплитудно модулирано променливо магнитно поле върху активацията на кръвните фагоцити. ....	33
3.1 Експериментални условия .....	33
3.2 Влияние на магнитното поле върху активацията на ПМН.....	33
4. Система за изследване на ХЛ спектър.....	35
4.1. Апаратен дизайн, измерване и изчисление на хемилуминесцентен спектър ....	35
4.1.1. Апаратен дизайн и измерване.....	35
4.1.2. Обработка на спектрални измервания, получени с "cut on" филтри. ....	35
4.2. Видове спектрални кинетични анализи и симултантност .....	37
4.2.1. Видове анализ на спектрални кинетични данни с нашата апаратура. ....	37
4.2.2. Видове спектрални кинетични анализи и симултантност.....	39
4.3. Изследване спектъра на нативна клетъчна ХЛ от Zymosan стимулирани ПМН. .....	39
4.3.1. Оптимизация на метода за спектрални луминесцентни изследвания .....	39

4.3.1.1.	Влияние на ПМН, RBC и плазмените компоненти върху клетъчната ХЛ в цяла кръв .....	40
4.3.1.2.	Избор на стимулант, буферна среда, температура и кръвно разреждане	40
4.3.2.	Нативни хемилуминесцентни отговори от Zymosan стимулирани изолирани ПМН и левкоцити в цяла кръв.....	41
5.	Разработване на система за in vivo / in vitro мониторинг на хемилуминесценцията в кръвен поток.....	46
5.1.	Принципна схема на системата за in vivo / in vitro мониторинг на хемилуминесценция в кръвен поток. ....	46
5.2.	Трудности при реализацията на in vivo и in vitro проточните системи и анализа на получените данни.....	47
5.3.	In vivo мониториране Zymosan стимулирана хемилуминесценция в кръвен поток .....	48
6.	Нова методика за изследване на функционалното състояние на левкоцитите в плеврални изливи.....	50
6.1.	Проблеми при използването на съществуващите хемилуминесцентни техники . .....	50
6.2.	Особености при използване на хемилуминесцентен метод за оценяване активността на ПМН от пациенти с плеврален излив.....	50
6.3.	Хемилуминесцентен метод за оценяване активността на ПМН от пациенти с плеврален излив .....	50
6.3.1.	Съхраняване .....	50
6.3.2.	Влияние на средата по време на записа на клетъчната ХЛ.....	51
6.3.3.	Състав на пунктатната измервана проба. ....	51
6.3.4.	Измерване на ПМН ХЛ в кръв и пунктат .....	52
6.3.5.	Обработка на „суровите“ ХЛ кинетични данни.....	53
6.3.6.	Защо характеристиката на пациенти с плеврален излив чрез сравнение ФС на пунктатните ПМН с ФС на ПМН от кръвта на пациента е полезна ?.....	53
6.4.	Апробиране на новата методика за изследване на функционалното състояние на левкоцитите при пациенти с плеврални изливи .....	54
6.4.1.	Функционално състояние на ПМН на изследваните пациенти.....	54
6.4.2.	Информативност на регистрираното ФС на ПМН в плевралния излив и какво трябва да се има в предвид при анализа му?.....	56
6.4.3.	Прехода на кръвните ПМН в плевралната кухина променя ли тяхното ФС? .....	59

6.4.4.	ФС на ПМН при трансудативни изливи.....	60
6.4.5.	ФС на ПМН при пациенти с инфекциозни заболявания.....	61
6.4.6.	Функционално състояние на ПМН при пациенти с карцином. ....	62
6.4.7.	Сравнение на разпределенията по ФС на ПМН при пациенти с инфекциозни заболявания и с карцином.....	64
6.4.8.	Сравнение на параметрите на ФС - С, Е, V, S1, S2 и S3 при пациенти с карцином и с инфекция. ....	65
6.4.9.	Диференциране на трансудативни от ексудативни изливи.....	66
V.	ИЗВОДИ.....	69
VI.	ПРИНОСИ.....	70
1.	Научни приноси с оригинален характер. ....	70
2.	Научни приноси с потвърдителен характер.....	70
3.	Приноси с научно-приложен характер .....	71
VII.	СПИСЪК НА КЛЮЧОВИТЕ ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИЯТА....	72
VIII.	СПРАВКА ЗА ОТКРИТИ ЦИТАТИ НА ПУБЛИКАЦИИТЕ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИЯТА.....	72
IX.	СПИСЪК НА КЛЮЧОВИТЕ НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИЯТА.....	75
X.	РАЦИОНАЛИЗАЦИИ.....	77
XI.	ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКИ ПРОЕКТИ, помогнали на дисертацията .....	77
XII.	ДЕКЛАРАЦИЯ ЗА ОРИГИНАЛНОСТ .....	78
XIII.	SUMMARY.....	78

**НАЙ - ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ**

**АФК** – активни форми на кислород

**ЕК** - ендотелна клетка

**ЛХЛ** - луминолова хемилуминесценция

**ПК** – плеврална кухина

**ПМН** – полиморфонуклеарни левкоцити/левкоцит

**ПОЛ** – прекисно окисление на липиди

**СЗН** - сърдечна застойна недостатъчност

**ФЕУ** – фотоелектронен умножител

**ФС** – функционално състояние

**ХЛ** – хемилуминесценция

**fMLP** – формил-метионил-левцил-фенилаланин

**СL** – хемилуминесценция

**Нб** – Хемоглобин

**KRP** – кребс Рингер фосфатен буфер

**LDH** - лактат дехидрогеназа

**LPS** - липополизахариди

**MF** - магнитно поле

**MPO** – миелопероксидаза

**NOX** – NADPH-оксидаза в ПМН

**NT-pro-BNP** - N-terminal pro-Brain natriuretic peptide

**PRRs** - Pattern Recognition Receptors

**RBC** - Еритроцити

## I. ВЪВЕДЕНИЕ

Хемилуминесцентните методи трайно заеха мястото на редица стандартни методи, базиращи се на абсорбционната фотометрия, емисионната фотометрия и радиоактивността. В сравнение с тях те имат предимството да предлагат по-висока чувствителност (до 1000 пъти), по-широк линейен обхват (още до 2 декади), ниска цена за тест и относително проста и немного скъпа екипировка.

Тъй като не притежавахме такава апаратура (търговските варианти струваха от порядъка на 15-25 хил. долара), то трябваше да я разработим от а до я. Катедрата по медицинска физика и биофизика на МУ Плевен имаше голям опит и традиция в тази посока, както и хора готови да го направят. Тогава става възможно и решаването на всички следващи идеи.

Левкоцитите в кръвта са един от основните компоненти на имунната система, обезпечавачи защитните реакции на организма и морфологичната хомеостаза (Badwey JA and Karnovsky ML, 1980 и всеки съвременен учебник по медицинска биология, имунология). Функционалната им активност осигурява активно придвижване до прицелното място, отделяне на цитотоксични продукти и биологически активни вещества, има интензивна комуникация чрез голям набор от рецептори, хормони, цитокини и хемокини с всички системи на организма за осъществяване на гореуказаните цели. Полиморфонуклеарните левкоцити (ПМН) са основен компонент на имунната система. Моментното им функционално състояние отразява както историята, случила се до момента, така и ролята, която играят в момента при възстановяване на евентуално дестабилизирана вътрешна среда.

Предполагам, че от еволюционна гледна точка адаптивният имунитет, появяващ се по късно, не заменя, а допълва и усъвършенства достигането на биологичните цели на имунитета. Освен това при организмите има интегритет и оптимизация за постигането на целите. Тогава няма основание да очакваме, че ПМН популацията като главен компонент на вроденият имунитет, ще има само ефекторна функция на разпознаване и отстраняване на чуждите патогени.

Освен това вроденият имунитет, и в частност ПМН, трябва да действат в синхрон и в синергизъм както с всички компоненти на имунната система, така и с процесите при възпалението, хематопоезата, ангиогенезата, регенерацията и др. Ето защо имаме основание да мислим, че трябва да съществува интензивна комуникация и взаимозависимост между вродения и придобития имунитет. При това делът на ПМН в имунитета, възпалението и др., както в норма, така и при патологии е много по голям от досега оцененият (Mantovani A et al, 2011). През последните двадесет години въз основа на редица изследвания бе доказано, че ролята на ПМН бе подценявана, а в някои случаи дори неправилно определяна (Mantovani A et al, 2011; Thomas C and Schröder K, 2013).

Това ни дава основание да твърдим, че обектът на нашите хемилуминесцентни (ХЛ) изследвания – ПМН, е в центъра на вниманието на научната общност, преосмисля се и променя неговата роля и може да очакваме нови резултати в тази посока.

Клетъчната хемилуминесценция е един от основните методи за количествена оценка функционалното състояние на редица типове клетки (ПМН, алвеоларни и перитонеални макрофаги и др.). Кинетиката на стимулирания със Zymosan отговор на клетките е свързан с кинетиката на продуциране на активни форми на кислорода (АФК), процесите на дегранулация - главно свързаните с миелопероксидазата (МРО), фагоцитозата, прайминга на клетките и др. Продукцията на АФК е един от основните механизми на



микробното „убиване“, но заедно с излетите протеази при дегранулацията и други токсични компоненти, предназначени за микробното убиване и смилане, може да имат редица нежелани странични явления, стоящи в основата на редица патологични процеси (Amulic, B. et al, 2012; Cascão et al, 2010, Karen L et al, 2009; Jodie L. Et al, 2009).

Тъй като при повечето от разработките ще се използват целокръвни хемилуминесцентни изследвания, то трябва да се намери корекция на хемилуминесцентният отговор в зависимост от броя неутрофили и еритроцити (RBC). Това би позволило сравняването на проби с различен брой неутрофили и RBC, което се дължи както на физиологичните и патологични вариации, така и на избраните по различни мотиви разреждания на кръвта.

За целите на спектралните ХЛ измервания трябва да се разработи методика за изчисление на реалната стойност на ХЛ интензитет при избраните дължини на вълните, като се отчита квантовата ефективност на фотоелектронния умножител и коефициента на пропускане на използваните филтри. За целите на различните спектрално-кинетични анализи трябва да се извлекат съответните данни от масива сурови експериментални данни.

Добре би било да се разработи система за *in vivo* / *in vitro* мониторинг на хемилуминесценция в кръвен поток, което би позволило да се изследва въздействието върху кръвта и/или опитното животно с избран фактор: електрично или магнитно поле, йонизираща радиация, инфра или ултразвук, биологически активни вещества и други.

Плевралните заболявания дълго време бяха медицинско поле със слаб интерес и развитие. Те бяха в страни от други полета, макар и със сравнима важност. Допреди десетина години съществуваше погрешното схващане, че плевралните болести са по-малко значими, в сравнение с другите респираторни заболявания и в този смисъл бяха извън основния поток от изследвания. Това сега се променя.

Плевралните изливи (ПИ) са често срещана проява при много белодробни и системни заболявания, в частност карциноми (27%), сърдечна застойна недостатъчност (СЗН) - 21%, пневмония (19%) и туберкулоза (9%) (Porcel JM et al, 2014).

В последните години се появиха плеврални изливи с нова етиология. Това са ПИ съпътстващи органните трансплантации и коронарните байпасни графтове. Това изисква нови изследвания свързани с новата етиология на плевралните изливи.

В България делът на възрастното население се увеличи в резултат на огромният брой емигрирали млади хора и такива в зряла възраст. С увеличаващата се възраст на населението се увеличават болните със СЗН, карциноми и пневмонии и от там се увеличава броят на плевралните заболявания.

За клиничната практика е изключително важна правилната и надеждна диагноза на ПИ за правилното лечение, добрата преценка на общата картина и прогноза за пациента.

Например правилната диагноза на туберкулозния ПИ е решаваща, защото при нелекуване има висок риск от развитие на дисеминирана туберкулоза през следващите няколко години.

Клиничният подход при лечението на пациент с ПИ изисква отговора на три въпроса – дали е нужна диагностична торакоцентеза, и ако е изтеглена плеврална течност, дали тя е от трансудативен или от ексудативен вид и каква е етиологията при ексудат.

Според данни от последните години продължава търсенето на надеждни и евтини методи за определяне типа плеврален излив, както и неговата етиология.

В голяма част от плевралните изливи с различна етиология има ПМН. Техният брой само при част от случаите е обективен показател за клиничното състояние на пациента и хода на патологичния процес, а освен това варира значително. ПМН в плевралната течност се различават по своите функционални характеристики от ПМН в кръвта. Тази разлика се дължи както на променения брой левкоцити в субпопулациите с различно функционално състояние, така и на променените функционални характеристики на отделните субпопулации.

Тъй като не са правени ХЛ изследвания на ПМН в плеврални течности, то това налага и разработката на съответната методика.

Следователно се очаква на база оценка на промененото функционално състояние на ПМН, да се подпомогне диференцирането на различните типове плеврални изливи, както и да се потърси връзка с етиологията им.

## **II. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ**

### **1. Събиране и съхранение на биологични материали**

#### **1.1 Кръв.**

Периферна венозна кръв бе колектирана в епруветки с хепарин (20 U/ml кръв). Кръвта стандартно бе съхранявана при стайна температура до два и половина часа.

#### **1.2 Пунктатна течност.**

От пациента първо се взема кръвната проба и след това се прави пункцията. Съхранява се като неразреден пунктат, с добавка на хепарин 20 U/ml.

### **2. Пациенти и диагностични категории**

В това пилотно проучване са включени 20 пациенти (Таблица 1) с плеврални изливи, появили се в хода на пневмония, туберкулоза, карцином, които бяха изследвани чрез торакоцентеза и торако плеврален дрен (pleurocan). Макар, че изследваните групи не са хомогенизирани по възраст, евентуални придружаващи заболявания, то тези замъгляващи фактоери донякъде са избегнати, впредвид, че някои от параметрите, влизащи в анализа са относителни – тоест характеризирани функционалното състояние на ПМН в кръвта спрямо тези в пунктата. Пациентите бяха проследявани до изясняване на диагнозата с микробиологично изследване (растеж на патогенни микроорганизми), хистологично изследване на биопсичен материал или адекватен отговор на терапията.

Изливите бяха категоризирани като ексудати и трансудати. Ексудатите по нататък бяха диференцирани на емпиеми, парапневмонични изливи, туберкулозни и малигнени. Емпиемата бе дефинирана като неутрофилен излив с растеж на бактерии върху микробиологични култури от посевка на плеврален пунктат и визуализиране на микроорганизмите. Парапневмоничните изливи бяха дефинирани като такива, възникнали при болни с пневмония без бактериален растеж от плеврален пунктат и без визуализиране на микроби на препарат по Грам. Туберкулозните изливи бяха дефинирани като онези с растеж на *Mycobacterium tuberculosis* и адекватно повлияване от туберкулостатична терапия. Малигнените ефузии бяха ексудати, свързани с патологоанатомично доказан карцином.

Пациент №	Диагноза	Пациент №	Диагноза
1	Сърдечна застойна недостатъчност	11	Миелопластичен синдром-предлевкемия
2	Пневмония дясно	12	Пневмония
3	Белодробен карцином	13	Асцит
4	Метастази в бял дроб, първично огнище другаде	14	Карцином
5	Туберкулоза	15	Пневмония
6	Киста черен дроб, нагнояване	16	Емпием
7	Пневмония двустранна	17	Туберкулоза
8	Белодробен карцином	18	Белодробен карцином
9	Белодробен карцином	19	Емпием
10	Пневмония двустранна	20	Карцином

**Таблица 1** Диагнози на пациентите и съответните ФС на ПМН популацията в кръвта и пунктатната течност.

### 3. **Работна карта на пациент с плеврален излив**

Тя е съставена, за да събираме необходимите биохимични, хематологични, цитологични, микробиологични и други данни за пациентите с плеврален излив с различна патология. Някои от полетата в реалната карта са с по-голям обем, за да покрият по-обемисти данни или повтарящи се измервания (общо е 4 стр.).

#### **ПАЦИЕНТ С ПЛЕВРАЛЕН ИЗЛИВ**

Име:.....Възраст:.....Пол:.....Стая /легло/: .....

Дата постъпване: ... История на заболяването N .....

Диагноза при постъпване: .....

Диагноза при изписване:.....

Придружаващи заболявания:.....

Изход от терапията към дата на изписване:.....

**ПАРАКЛИНИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ****КРЪВ****КРЪВ-ХЕМАТОЛОГИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ**

			Диференциална картина, %		
Дата	RBC x10 <sup>9</sup> /ml	Leu x10 <sup>6</sup> /ml	PMN	Ly	Mo

**МИКРОБИОЛОГИЯ НА ХРАЧКА**    Растеж    да....не.....неизследвано

**ПУНКЦИЯ****МАКРОСКОПСКИ ВИД**

		Цвят						Прозрачност		
Дата	Колич. ml.	Бледо- жълт	Хемо- раги- чен	бял	Ж ъ л т	Зеле- никав	д р у г	Мъте н	Бис- тър	друг

**ЦИТОЛОГИЯ НА ПУНКТАТА**

					Диференциална картина, %								
Д а т а	Общ брой клетки x10 <sup>6</sup> /ml	Hb g/l	RBC x10 <sup>9</sup> /ml	Leu x10 <sup>6</sup> /ml	J	St	Sg	Eo	Ba	Ly	Mo	Pl	Морфо логия

**МИКРОБИОЛОГИЯ НА ПУНКТАТА** .....

**БИОХИМИЯ НА ПУНКТАТА**

Дата	Глюкоза Mmol/l	Холестерол Mmol/l	Зглицериди Mmol/l	Албумин g/l	Амилаза U/l	Хипурилур. к-на	Общи Мазти g/l	ПатГлобулини g/l	Общ белтък g/l	LDH U/l

**ЛЕЧЕНИЕ**

ДАТА	ПРЕПАРАТ	ДОЗА	БРОЙ ПРИЕМИ НА 24 ЧАСА	ПРОДЪЛЖИТЕЛ НОСТ

**АНАМНЕСТИЧНИ ДАННИ**

ДАВНОСТ НА ПРОЦЕСА .....

ФАЗА НА КЛИНИЧНОТО СЪСТОЯНИЕ.....

ЗАБЕЛЕЖКИ.....

**4. Реагенти****4.1 Zymosan**

Зимозан беше получаван от хлебни дрожди съгласно (Hadding et al., 1970). Сто грама хлебни дрожди бяха разтваряни в 2L 0.1mol/l фосфатен буфер (pH 7.4) и центрофугирани и промивани двукратно в същия буфер. След втората центрофугираща стъпка дрождите бяха ресуспендирани в 200 ml от същия буфер, автоклавирани 20 минути при 120°C и съхранявани при 4°C в 0.5 ml аликвоти. Качеството на описаните процедури бе изследвано чрез съпоставянето на изявяваната ХЛ кинетика получавана след симултантно стимулиране на фагоцитите със зимозан получен по горната процедура и зимозан- А (Sigma).

Зимозанът беше опсонизиран 30 мин. при 37°C в нормален човешки серум (20 mg/ml), измит двукратно в 0.9% NaCl и лиофилизиран. Зимозановата

суспензия в Кребс Рингер фосфатен буфер (KRP) беше приготвяна непосредствено преди употреба.

#### 4.2 Луминол.

Луминол - (5-amino-2, 3-dihydro-1, 4-phthalazinedione) (Fluka), беше използван за усиляване на хемилуминесценцията. Базовият разтвор на луминола (10 mmol/l в диметил сулфоксид - DMSO) беше съхраняван на тъмно при стайна температура и разреждан 1:10 с KRP преди употреба. Във всички експерименти, ако изрично не е указано друго, крайната концентрация на луминола е 10  $\mu$ mol/l.

#### 4.3 Буфер.

Във всички опити беше използван модифициран KRP. Композицията на му беше 119 mmol/l NaCl, 4.75 mmol/l KCl, 0.420 mmol/l CaCl<sub>2</sub>, 1.19 mmol/l MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 16.6 mmol/l sodium phosphate buffer, pH 7.4, and 5.56 mmol/l glucose (De Sole P et al, 1983).

### 5. Изолация на ПМН.

Изолирането им беше извършвано чрез градиентно центрофугиране - Procedure No 1119, "Sigma Diagnostics".

1. Четири 10 мл епруветки се силиконизират - 1 час при 100°C.
2. Нанася се Histopaque в две области с различна плътност в 2 епруветки.
  - а) Нанася се на дъното на епруветката 3 ml от по-плътната среда (с плътност 1.119).
  - б) Върху по-плътния слой се нанасят 3 ml от втората среда (с плътност 1.077). За да се избегне размесване средата се поставя по малко и внимателно с тръбичка с изтънен и извит край.
  - в) Кръвта се засмуква с пипета и внимателно на капки се нанася отгоре.

Тарират се епруветките (чрез добавяне на кръв) и се центрофугират при 700 g - около 3000 об./мин. за 30 мин.
3. След центрофугирането в епруветките се наблюдават няколко слоя: плазма, моноцитен слой, прозрачен слой, неутрофили, еритроцити.
  - а) с автоматична пипета с кръгови движения се изсмуква плазмата.
  - б) засмуква се моноцитния слой до прозрачния.

в) с кръгово движение се засмуква неутрофилния слой. Не се изсмуква напълно, за да не се смеси с еритроцитния слой. Неутрофилите се поставят в силиконизирани епруветки.

4. Неутрофилите се промиват двукратно чрез центрофугиране с по 10ml KRP по за 10 мин. на 200 g - около 1500 об. /мин.

#### **6. Изолация на RBC.**

Следвана е методиката описана в Steck, 1974, като е използвана прясно взета от пациента кръв с добавка на 20 U/ml хепарин като антикоагулант. Всички операции са извършвани при 0 - 5°C. Кръвта се смесва с приблизително равен обем 150 mM NaCl в 5 mM натриево-фосфатен буфер, рН 8. 0 и се центрофугира в летящ ротор 10 мин. при 1500 - 2000 g. Супернатантата и левкоцитният слой се отстраняват чрез изсмукване с пастърова пипета и част от горния слой от утаените еритроцити. Утаените еритроцити се суспендират в около 4 обема буфериран изотоничен NaХЛ и се промиват трикратно при посочените вече условия. От 25 ml цяла кръв се получава около 9 ml пакетирани клетки ( $8 \div 10 \times 10^9$  клетки/ml), които могат да бъдат използвани за получаване на еритроцитна суспензия чрез ресуспендиране в равен обем изотоничен разтвор на NaХЛ.

#### **7. Определянето на общия брой левкоцити и RBC в кръв и в пунктат**

Определянето е по стандартните методи с Bürker камера.

#### **8. Диференциално броене на елементи от белия кръвен ред в материали от плеврални пункции**

Използват се материали, получени чрез плеврална пункция, с цитрат като антикоагулант. За да се предотвратят автолитични промени в клетките, диференциално броене се извършва само на материали, получени непосредствено или в рамките на 30 мин. преди лабораторната обработка, по следната методика:

1. Центрофугиране за 10 мин. при 1000 об./мин.;
2. Разстилане на седимента върху 4 предметни стъкла и сушене на въздух – 24 ч.
3. Фиксиране на 2 бр. от препаратите в 95 % спирт за 30 мин.
4. Оцветяване на фиксираните в спирт препарати по стандартна методика с хематоксилин-еозин /HE/.
5. Оцветяване на фиксираните само на въздух останали 2 бр. препарати с боя May-Grünwald-Giemza /Papenchaim/.
6. Сушене на въздух.
7. Просветляване с парафин.



## 8. Микроскопиране.

Отчитането на кръвните елементи от белия кръвен ред се извършва на увеличение 160 посредством П-образно движение на препарата в 2x2 срещуположни зрителни полета, разположени между периферната и средната част на препарата. От всеки препарат се изброяват 100 бр. клетки от белият кръвен ред. Получените резултати се усредняват за всеки тип кръвен елемент.

## 9. Определяне на типа излив според критериите на Light

Използват се критериите, описани в **Light RW et al, 1972**.

Общ белтък и LDH в плевралната течност и серума са определяни в клиничната лаборатория.

- Общ белтък плеврална течност / Общ белтък серум > 0.5

- LDH плеврална течност / LDH серум > 0.6

- LDH плеврална течност > 133 U/l

При изпълнени на поне две от горните условия, изливът се приема за ексудативен.

## 10. Хемилуминесцентни измервания и оценка функционалното състояние на ПМН.

### 10.1 Хемилуминесцентни измервания

Всички компоненти на тестваната проба, с изключение на кръвта или плевралната течност или изолираните ПМН, са предварително термостатирани в кюветодържателя на хемилуминометъра при 37° C за 5 мин. След добавяне на кръвта или плевралната течност или изолираните ПМН, пробите се измерват симултантно от 6 пробния луминометър, работещ в режим на квантометрично броене (Bochev P, Bechev B, Magrisso M, 1992). Избира се подходящ режим на измерване, в зависимост от това дали се цели интегрални или вид спектрални кинетични ХЛ измервания.

Ако не е указано друго, то пробата е с общ обем 2 мл., съдържаща луминол ( $10^{-5}$  M), Zymosan (0.3 mg/ml), кръв или плевралната течност или изолирани ПМН в указаните за съответния експеримент разреждания или концентрации.

### 10.2 Обработка на получените „сурови“ данни за оценка функционалното състояние на ПМН.

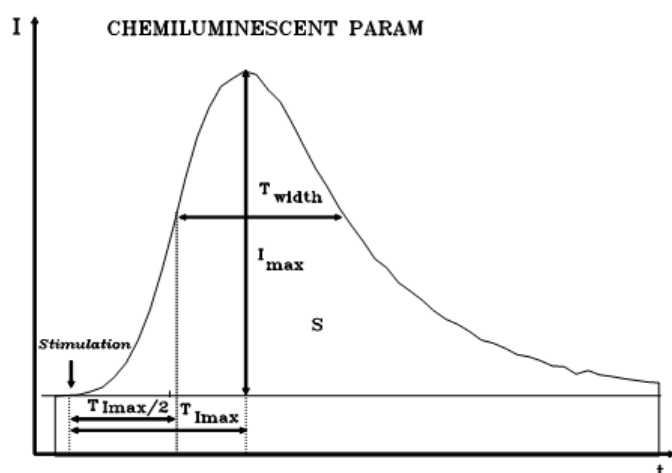
#### 10.2.1 Първична обработка.

Получените от всяка проба хемилуминесцентни кинетики са коригирани относно апаратния и кюветен фон. Прави се и корекция по отношение на броя ПМН и еритроцити (Bechev et al, 1993). В детайли това е развито в раздела резултати и дискусия. Данните са апроксимирани с използване на кубичен сплайн (Bochev P., Bechev B, 1988).

#### 10.2.2 Оценка функционалното състояние на ПМН

##### 10.2.2.1 На база изчисляване на стандартни ХЛ параметри.

За всяка кинетична крива се изчисляват ХЛ параметри –  $I_{max}$ ,  $S$ ,  $T_{I_{max}}$ ,  $T_{I_{max}/2}$  и  $T_{width}$  (Фиг. 1) или време от левкоцитната стимулация до началото на отговора (лаг тайм), скоростта на ХЛ нарастване и спад (наклони) – Фиг. 2.



**Фиг. 1** Параметри на кинетична ХЛ крива

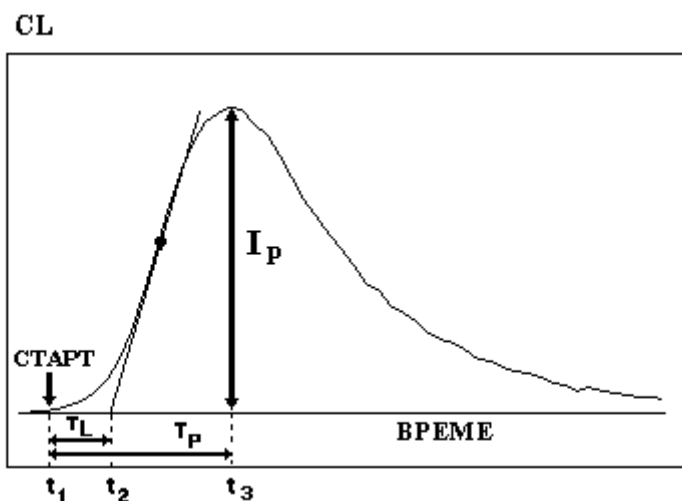
$T_{I_{max}}$ ,  $T_{I_{max}/2}$  – характеризира функционалната готовност на ПМН популацията да реагира бързо на стимула;

$T_{width}$  - характеризира функционалната

готовност на ПМН популацията

да поддържа възможното “високо ниво” на генерация на АФК;

$I_{max}$  - характеризира достигнатото максимално ниво на генерирани АФК;  $S$  - характеризира капацитета на ПМН за генерация на АФК;

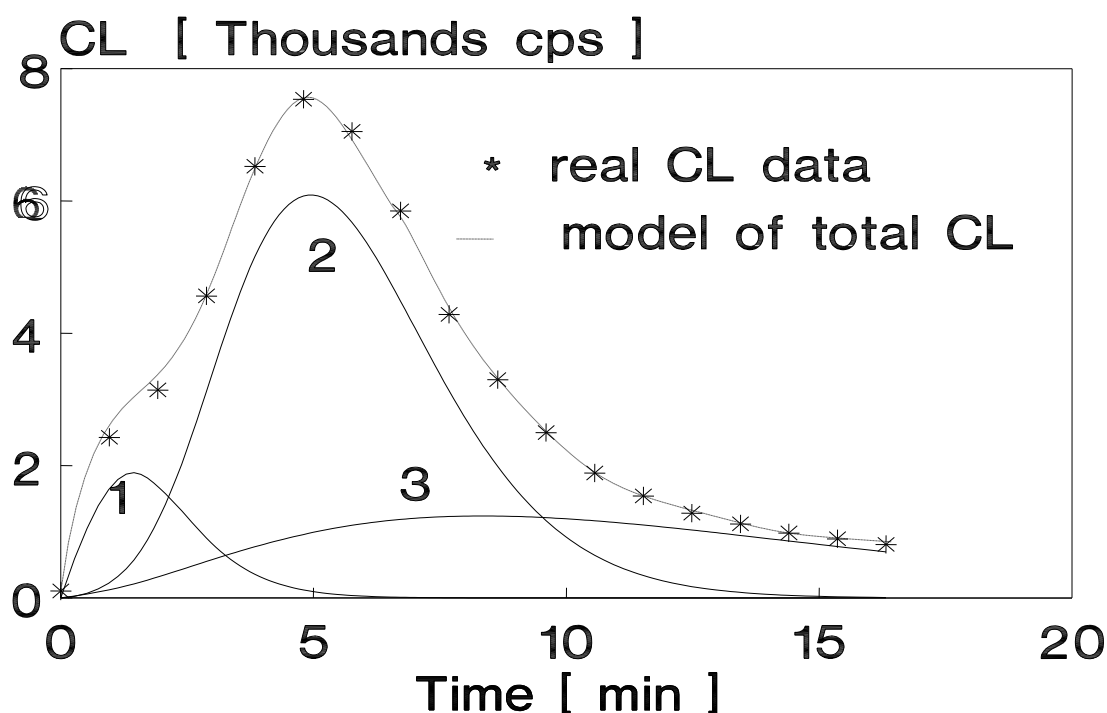


**Фиг. 2** Други параметри на кинетична ХЛ крива. Време от левкоцитната стимулация до началото на отговора ( закъснение началото на отговора), скоростта на ХЛ нарастване и спад (наклони) и площ под кривата (площ) –( Бечев Б и съавтори, 1992; Магрисо М, Бечев Б, Бочев П, 1989).

#### 10.2.2.2 На база изчисляване параметри на компонентен модел на кинетичните ХЛ криви.

Използва се моделирането, описано в статията Magrisso M, Vechev B et al., 1995. Накратко, може да го опишем по следния начин (Фиг. 3).

**Избран модел.** При анализа на ХЛ данни се показва, че по критериите сложност и относителна организация на биосистемата, емитираща ХЛ, кинетичната ХЛ крива би се описала с вероятностно разпределение. Тъй като за времето на ХЛ кинетика - 30-60 минути се регистрира около 1 импулс / клетка, то регистрираният ХЛ интензитет може да се опише с разпределението на редките събития, тоест с разпределение от Поасонов тип. При това нека приемем, че имаме няколко процеса, които се включват в ХЛ отговор и на всеки от тях съответства някакво разпределение от поасонов тип, със свои собствени параметри (Фиг. 3).



**Фиг. 3** Тоталната моделна кинетична крива е сума от криви 1, 2 и 3, представящи съответно първа, втора и трета моделна компонента. Имаме добра интерполация спрямо експерименталните данни.

Интензитета на всяка компонента се дава с израза:

$$I^N(t) = N_i \cdot \lambda_i \cdot m_i \cdot \frac{(\lambda_i t)^{m_i}}{m_i!} e^{-\lambda_i t} \quad (1)$$

За всяка (i-та) компонента -  $\lambda_i$  е средният брой регистрирани пакети светлина за единица време,  $m_i$  - капацитетът от пакети светлина на светещия център, а  $N_i$  - броят еднотипни регистрирани центрове, имащи еднакви  $\lambda_i$  и  $m_i$ , излъчващи от клетките. а  $N_i$  е функция на концентрацията използван луминол и общата стимулирана фагоцитна повърхност, при използвания стимулант – Zymosan (Magrisso M, Bechev B et al, 1995).

При анализа на процесите, съответстващи на компонентите са направени следните изводи:

Първата компонента отразява извънклетъчна ХЛ, свързана с поглъщането на Zymosan, вероятно МРО - зависим процес.

Втората компонента отразява вътреклетъчна ХЛ вътре във фагозомата (фагозомите), азид (вероятно МРО) - зависими процеси, свързани с поглъщането.

Третата компонента отразява по-продължителни, предимно вътреклетъчни процеси, водещи до вътреклетъчна ХЛ. Тези процеси не са пряко свързани с поглъщането. Третата компонента навярно е съставена от няколко компоненти – тя е частично МРО-зависима и веригата от съответстващи процеси се разклонява по няколко пътя, доказателство за което е нестабилността на нейното време на пика.

**ХЛ кинетика се моделира с три компоненти** при всички наши експерименти. За получените от всяка проба хемилуминесцентни кинетики се построява моделен ХЛ интензитет, като сума от 3 компоненти ( $n=3$ ) от Поасонов тип разпределение (Фиг. 3):

$$(2) \quad I_{tot}(t) = \sum_{i=1}^n N_i \cdot \lambda_i \cdot m_i \cdot \frac{(\lambda_i t)^{m_i}}{m_i!} e^{-\lambda_i t}$$

При моделирането се използва итерационен метод, чиято цел е намиране на такива стойности на параметрите  $\lambda_i$ ,  $m_i$ ,  $d_i$  и  $N_i$  на компонентите в използвания модел (уравнение 1), че да има максимална корелация между записания и моделния ХЛ интензитет (Magrissio M, **Bechev B.** et al, 1995).

Всички параметри на трите компоненти описват функционалното състояние на ПМН популацията.

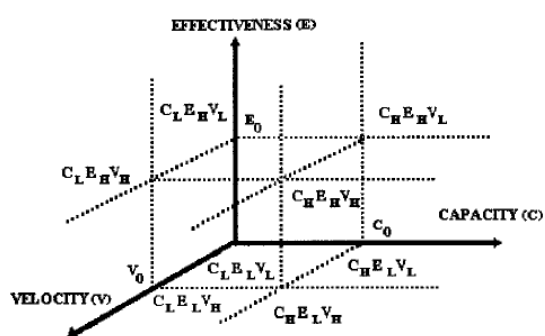
**Може да се дефинират три обобщени параметъра, и на тяхна база да се направи класификация на функционалното състояние на ПМН популацията.** ( Magrissio M et al, 2000).

Тези обобщени параметри се дефинират както следва:

*Капацитетът (C)* се представя от абсолютния общ ХЛ капацитет на единица клетки, отразяващ капацитета да генерира АФК; *Ефективността (E)* се представя като отношението на абсолютния капацитет на втората към този на първата компонента. Капацитетът на първата и втората компонента са пряко свързани съответно с вътреклетъчното и извънклетъчното генерирани АФК по време на фагоцитозата. Колкото по голямо количество АФК се изливат вътреклетъчно, свързано с фагоцитозата, толкова по-ефективно ще работи клетката.; *Скоростта (V)* се представя като отношение на сумата от абсолютните капацитети на първата и втората компоненти към общия абсолютен капацитет на ХЛ кинетиката. ПМН отговора се реализира с висока скорост при увеличаване на обобщения параметър Скорост.

**Използвайки** тези обобщени параметри като координати на три-измерно пространство (CEV пространство), всяко състояние на ПМН може да се опише количествено (Фиг. 4). Всяка точка на това пространство представя различно функционално състояние, характеризиращо се с различен функционален потенциал за генерация на АФК, различни съотношения на извън и вътреклетъчните АФК и др. CEV пространството може да се раздели на подпространства, като се използват праговите стойности  $C_0$ ,  $E_0$  и  $V_0$ . Стойностите над и под тези стойности съответно ще отбелязваме с Н и L. Този подход позволява да се различат някои функционални състояния с биологична релевантност – „спокойно“ състояние, състояние „готовност“, „ефективно“

състояние, „бойно“ състояние, „алтернативно активирано“ състояние, „възпрепятствано“ състояние, „активирано“ състояние, „възстановяващо“ състояние.



**Фиг. 4** Функционални състояния на ПМН съгласно SEV координатите. С – капацитет, Е – ефективност, V – скорост. Трите координати характеризират еднозначно функционално състояние. Пунктирните линии задават праговата стойност между High и Low стойностите за съответната координата. (за детайли виж текста)

Например: Състояние „готовност“ (*Stand-by state*). Това състояние отразява ранна активация на ПМН, които са далеч от фокуса на бактериално възпаление (Zgliczynski JM et al, 1988). Резултата от компонентния анализ показва, че в това състояние капацитета не е достигнал все още високо ниво, ефективността е ниска и скоростта е средно до високо ниво. ( $C_L E_L V_H$ ). „Ефективно“ състояние (*Effective state*). В това състояние отговора е развит с висок капацитет, скорост и ефективност ( $C_H E_H V_H$ ).

## 11. Хемилуминесцентен тест за оценка активността на ПМН в пунктата и кръвта на пациенти.

Първа стъпка е пилотно измерване за определяне разреждането на пунктата. Като се има пред вид броя на ПМН и еритроцитите в пунктата, и чувствителността на ХЛ апаратура, се избира набор разреждания на пунктата, с които се пуска това пилотно измерване за установяване максимално възможното разреждане.

Втора стъпка е симултантно ХЛ измерване на изследваните проби с кръв и пунктат при избраното в първа стъпка разреждане. Измерват се по три проби с кръв и три с пунктат. Като резултат се получават две групи от по три ХЛ криви – съответно за изследваните кръв и плеврална течност.

След което се прилага обработката на данните, описана в II 10.2.

В детайли тази нова методика е описана в раздела Резултати и дискусия.

След което тези параметри на ХЛ отговора от Zymosan стимулираните ПМН в плевралната течност са сравнени с тези от ПМН в кръвта при един и същи пациент.

## 12. Статистически анализ

За тестване дали едно разпределение е нормално използваме теста на Колмогоров – Смирнов или на Shapiro-Wilk.

За достоверни различия между променливите с не Гаусово разпределение, характеризиращи отделните изследвани групи, са използвани Mann - Whitney U test и Kruskal Wallis или при нормално разпределени променливи t-test на Student и еднофакторен или двуфакторен анализ на варианса (ANOVA). За праг на значимост е прието  $p < 0.05$ .

Използван бе линеен дискриминантен анализ на Fisher за да намерим дискриминантна функция (която е линейна комбинация на множество количествени ХЛ параметри, характеризиращи ФС на ПМН), която разделя две изследвани групи.

Определяме чувствителност и специфичност на различни диагностични дихотомни методи по стандартния начин, с използване на съответен златен стандарт.

### **III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ**

Цел на работата е изследване на функционалното състояние на фагоцитиращи клетки в различни биологични течности чрез развитие и усъвършенстване на хемилуминесцентни (ХЛ) методи.

#### **За тази цел са поставени за решаване следните задачи:**

- Създаване на апаратни, хардуерни и софтуерни средства, необходими за интегрални и спектрални хемилуминесцентни изследвания.
- Развитие и усъвършенстване на *in vitro* методиките за изследване на функционалното състояние на левкоцитите в цяла кръв чрез сенсibiliзирана хемилуминесценция и приложението им.
- Спектрални ХЛ изследвания на функционалното състояние на изолирани ПМН и левкоцити в цяла кръв.
- Разработване на система за *in vivo* / *in vitro* мониторинг на хемилуминесценция в кръвен поток и апробирането и.
- Създаване на *in vitro* методика за изследване на функционалното състояние на левкоцитите в плеврални изливи и приложението и за диагностика.

#### IV. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

За клетъчна хемилуминесценция може да се използват течносцинтилационни броячи, работещи в режим на несъвпадение, позволяващ еднофотонно броене. Те не са подготвени за биологични проби, изискващи температури над стайните. Няма и необходимия специализиран софтуер.

По времето, когато бе създаден луминометърът, друга възможност бяха специализираните луминометри, произвеждани от редица фирми: LKB, Berthold, Hamilton, Hewlett Packard, Dynatech и др.. Повечето от тях са приспособени за измерване на клетъчна хемилуминесценция със силно различаваща се чувствителност до над 5000 пъти (Jago PH et al, 1989).

До момента на създаване на апарата, нямаше търговски апарати за клетъчна хемилуминесценция със спектрален анализ.

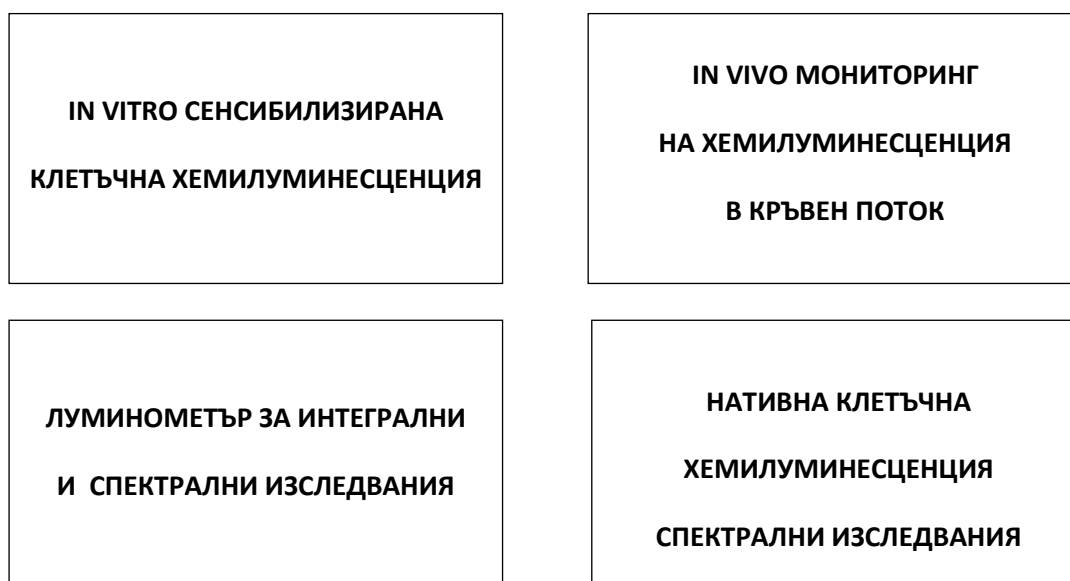
Няма промишлени апарати за мониторинг *in vivo* и *in vitro* на излъчвана хемилуминесценция в кръвен поток. Ето защо би представлявало голям интерес, особено *in vivo*, изведено екстракорпорално кръвообращение със съответната апаратна хемилуминесцентна част.

Ние сме разработили за целта необходимите апаратни, хардуерни и софтуерни средства.

Разработили сме и/или подобрили редица методики, заедно с тяхното приложение в нови области.

#### Области на развитите / усъвършенствани в работата

хемилуминесцентни апарати, методи и приложения за клетъчна луминесценция



## 1. Създаване на апарат за интегрални и спектрални хемилуминесцентни измервания

### 1.1. Изисквания към луминометъра, необходими за постигане целта на работата

За да има възпроизводимост, достоверност и коректна интерпретация на получените данни, измерителния комплекс трябва да осъществява многократно и симултантно измерване (Бечев Б, Магрисо М, 1988).

Това е от особена важност за лабилните биологични проби. Следва анализ на получените данни с помощта на компютъра.

- ✓ а) измерване на интегрална хемилуминесценция
- ✓ б) чувствителност, необходима за нативните клетъчни ХЛ измервания
- ✓ в) симултантно измерване на до 6 проби
- ✓ г) спектрален анализ с интерференчни или "cut-on" филтри
- ✓ д) температурна стабилизация на пробите и детектора
- ✓ е) компютърно осигуряване автоматизацията на измерването
- ✓ ж) регистриране на данните, първична и вторична обработка от компютърния хардуер и софтуер

Осъществили сме компютризирана измерителна система, която удовлетворява гореописаните изисквания. Тя може симултантно да измерва ХЛ емитирана от до 6 проби, в до 6 дължини на вълната (или 6 спектрални прозорци), обработка на данни и следващ анализ на формата и величината на кинетичните ХЛ криви.

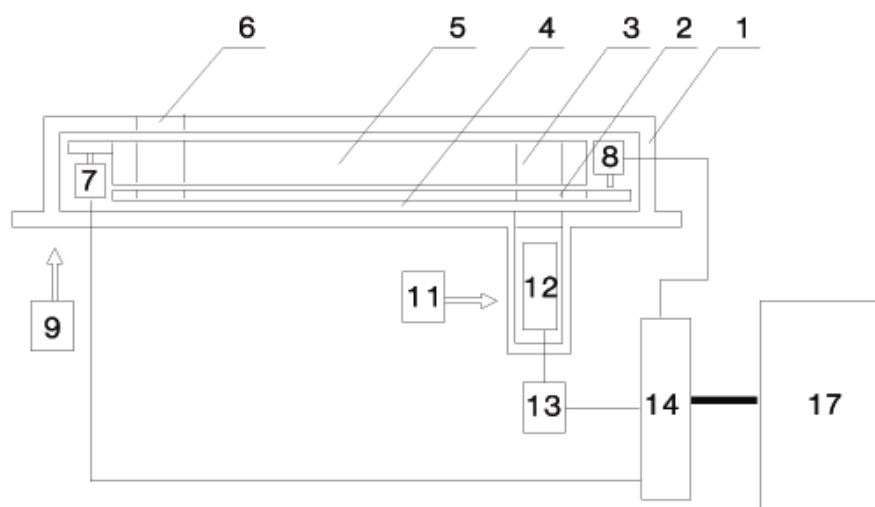
### 1.2. Принципно устройство на апарата

Разработена е компютризирана апаратура за симултантни интегрални и спектрални хемилуминесцентни измервания. Тя работи с до 6 проби и до 6 интерференчни или cut-on филтри. Могат да се настройват различни интегрални или спектрални измерителни режими и настройка на: брой кювети, брой филтри, интегриращо време (кратно на 10 ms), време на опита, режим на добавяне на реагенти и др. Оптимизирана е симултантността при различен брой проби и филтри. Отделни модули и цялостната апаратура са публикувани и докладвани в Бечев Б, М. Магрисо; 1988; Бочев П, Бечев Б, 1988; Бечев Б и съавтори, 1989; Vochev P et al, 1991; Vochev P et al, 1992, както и в трите рационализации, дадени в глава XI.

Системата за изследване ХЛ спектър е реализирана, като към базовия луминометър е добавен спектрален селектор, съдържащ интерференчни или cut-on филтри. Суровите данни получени за всяка дължина на вълната са коригирани съгласно квантовата ефективност на фотоелектронния умножител (ФЕУ) и съответния коефициент на пропускане на интерференчния или "cut on" филтър. Потвърдени са ХЛ спектрални данни, намерени в две групи независимо от нас и отразени в две публикации.



Принципната схема на устройството на апарата е показана на Фиг.5.



**Фиг. 5** Принципна схема на разработеният луминометър. 1 –Светлинно изолирано пространство, 2 – Оптични филтри, 3 - Кювети, 4 – Диск с гнезда за филтрите, 5 - Диск с гнезда за, кюветите, 6 – Отвор за добавки, 7, 8 – Стъпкови мотори, 9 - Термостат, 11 - Охладител, 12 – Фотоумножител, 13 – Усилвател-дискриминатор, 14 – Интерфейсен управляващ модул, 17 - Компютър

Съществуват пространствено светлинно и термично отделени пробна и измерителни секции, функционално свързани и оперират под компютърен контрол.

Секцията за проби осигурява подходящи условия за измервания на излъчената от пробите светлина. В светлинно-изолираното пространство ротационния кюветодържател (5) има шест 15 мл цилиндрични кювети (3) за пробите. Кюветодържателят се поддържа при избрана температура (от 25 - 45 °С с точност 0, 2 °С) чрез въздушен термостат (9). Кюветодържателят може да се върти непрекъснато под компютърен контрол и всяка проба може да се позиционира последователно пред ФЕУ за измерване. Кюветодържателят е диск с периферно разположени цилиндрични места за оптичните кювети. Дискът с гнезда за оптичните cut-on или интерференчни филтри е разположен между кюветодържателя и ФЕУ-то и е съосен на кюветодържателят. Това аранжиране позволява сканиране на пробите и филтрите, минимален оптичен път между тях и светлинният детектор (12) и оптимално събиране на светлината (с минимални загуби).

Измерителната секция съдържа ФЕУ (12), работещ в квантометричен режим и електронна система: ниско- и високо-волтово захранване, импулсен усилвател, амплитуден дискриминатор и други второстепенни единици. ФЕУ се използва като светлинни детектори. За подобряване на отношението сигнал/шум и тока на тъмно ФЕУ се охлажда (11). Броят електрически импулси на изхода на ФЕУ е пропорционален на броят емитирани от пробата фотони. Тези импулси се усилват и се отделят от шума от усилвател / дискриминаторния модул (13) и през интерфейса (14) попадат в микро-компютъра (17) и техният брой представя хемилуминесцентния интензитет (имп./с).

След установяването на изискуемите параметри за избраният режим на действие на апарата и стартиране на измерванията, кюветодържателя (5) и филтродържателя започват да се въртят, позиционират, измерват се и записват данните под компютърен контрол в съответствие с избраният режим. Сканирането на кюветите и филтрите продължава за избраното предварително време на опита.

### **1.3. Софтуерно осигуряване**

#### **1.3.1. Избор на режим на измерване и състав на пробата**

Възможни са различни интегрални и спектрални измерителни режими, отличаващи се по своите избираеми параметри: брой кювети (от 1 до 6), брой филтри (от 1 до 6), интегриращо време, тотално време на опита и др. Те се избират преди старта на измерването. За улеснение сме разработили система на шаблони (templates) включваща избрания режим на измерване и всички настроени параметри, както и съдържанието на кюветите. Може в движение да се добави реагент по време на опита, което се отбелязва в файла, описващ опита.

#### **1.3.2. Управление на системата за сканиране, възприемане и запис на "суровите" данни**

Създадохме програма с асемблерска част, която контролира с датчици сканирането и позиционирането на кюветите, "броящото време", времето на опита, възможностите за различни типове прекъсвания, добавка на реагенти, запомняне на данните получени от всяка кювета. Хемилуминесцентният интензитет на максимум 6 криви се мониторира на дисплея (с автоматично премащабиране при достигане горната част на екрана с коефициент 0.5, както и при достигане дясната граница на екрана) и след завършване на опита данните се записват автоматично на носител.

#### **1.3.3. Специализиран софтуер за ХЛ измервания (обработка след приключване на измерванията).**

Анализаторът е организиран за относително пълна обработка на кинетичните хемилуминесцентни данни (Магрисо М, Бечев Б, Бочев Б, 1989).

а) първична обработка на суровите данни (докладвана или публикувана в (Магрисо М, Бечев Б, 1987; Бечев Б, Магрисо М, 1988; Vochev P., Bechev B, 1988)

Може да осъществява интерполация, апроксимация и премащабиране на кинетични криви, добавяне или изваждане на константа.

б) вторична обработка (докладвана в Бечев Б, Магрисо М, 1988).

✓ деривация на нови данни

Могат да се получат дериватни нови данни - усредняване, "разлика", "частно" от изходните "сурови" кинетични данни.

✓ параметри на пика

Анализатора изчислява в off-line режим някои параметри на хемилуминесцентни кинетични криви, необходими за анализа на клетъчната ХЛ - времето от левкоцитната стимулация до началото на отговора (лаг тайм), времето необходимо за достигане на максимална активност (време до пика), стойността на този максимум (пик), скоростта на ХЛ нарастване и спад (наклони) и площ под кривата (площ) – виж II 10.2.2.1 (Магрисо М, Бечев Б, Бочев Б, 1989).

✓ изход на данни за печат и ASCII файл

Системата позволява запис на избрания режим на работа и неговите параметри - брой кювети, "броящо време", тотално време на опита, съдържание на кюветите, количества добавки и време на добавяне и др.

Освен това получените сурови или обработени данни от ХЛ измерванията могат да се запишат в "ASCII delimited" формат, подходящ за електронни таблици, графични пакети, статистически пакети и др.

## **2. Усъвършенстване методиката за целокръвни хемилуминесцентни изследвания**

В методиката за изследване на функционалното състояние на левкоцитите в цяла кръв чрез сенсibiliзирана хемилуминесценция е разширен диапазона за нормиране на ХЛ параметри спрямо броя ПМН ( $3 \times 10^3$  /ml до  $6 \times 10^5$  /ml), както за пика, така и за времевия интервал около него ПМН ( $6 \times 10^3$  /ml до  $3 \times 10^4$  /ml). Установена е линейна зависимост в логаритмичен мащаб между нормирания ХЛ отговор и концентрацията на RBC в пробата за времевия интервал около пика, чиято продължителност зависи от концентрацията на RBC. Това позволява сравняване на функционалното състояние на левкоцитите от различни пациенти имащи различна концентрация на еритроцити и ПМН, опити с различни кръвни разреждания, оценка влиянието на плазмените компоненти по време на фагоцитния отговор (Bechev et al, 1993).

### **2.1. Предпоставки за усъвършенстването**

Луминоловата хемилуминесценция (ЛХЛ) на цялостна кръв е добре приложим метод за клинични изследвания, защото е прост, бърз, изисква малки обеми кръв и в сравнение с тестовете осъществявани с изолирани ПМН избягва артефактите, дължащи се на клетъчната изолация. Когато се използва целокръвна ХЛ, възникват някои трудности, свързани с различни фактори, които може да повлияват отговора на ПМН – обем на пробата, разреждане, брой ПМН и RBC, и др. Основните кръвни компоненти, които определят ЛХЛ отговор са ПМН и RBC. В по-малка степен плазмата на кръвта също може да модифицира ЛХЛ като скавенджира кислородните радикали, произведени по време на фагоцитната активация и като повлиява някои клетъчни функции. При това клетъчното и плазменото съдържание на тестваните проби, количествено определящо ЛХЛ отговор, зависи от субекта и от степента на кръвното разреждане. За да могат да се сравнят ЛХЛ отговори получени от кръвни проби при пациенти с различна концентрация на ПМН и RBC или от различно разреждени проби, първоначално получените сурови данни трябва да бъдат нормирани.

При работа с много високи или с много ниски разреждания на кръвта се прави съответната корекция за RBC и ПМН, която е валидна само за максималният

хемилюминесцентен интензитет. Нужно е да се установят границите на приложимост на корекциите. Трябва да се оцени активността на ПМН както като изолирани клетки, така и в среда близка до естествената и отдели влиянието и на другите компоненти на кръвната среда, освен тези на ПМН и RBC в хемилюминесцентния отговор.

## 2.2. Влияние на концентрацията на ПМН в общият ХЛ отговор

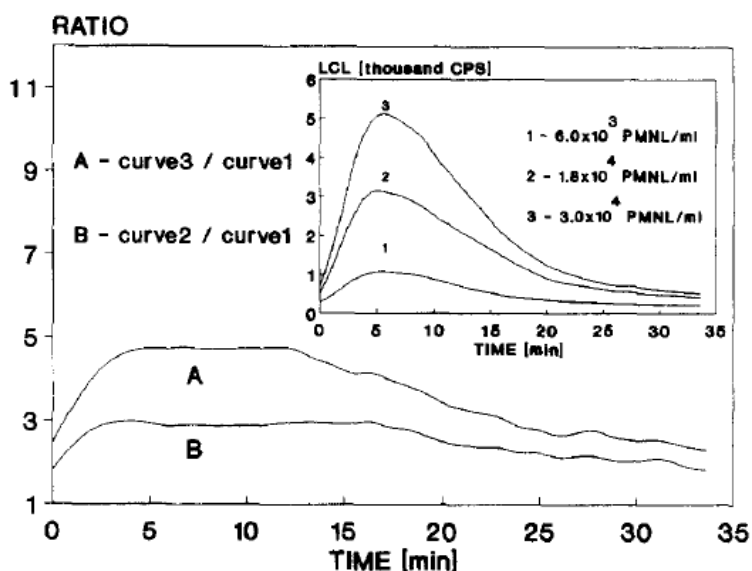
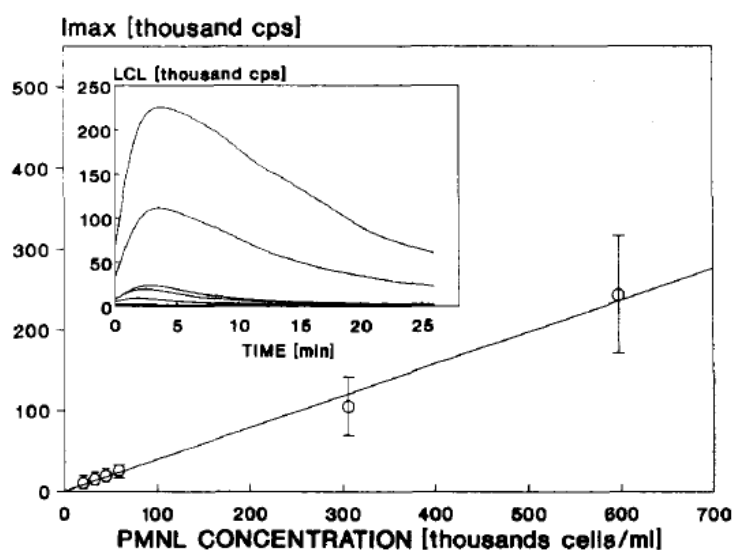
В една първа серия експерименти бе изследвано влиянието на броя ПМН върху Zymosan стимулирания ЛХЛ отговор на изолирани ПМН в широк диапазон от клетъчни концентрации (концентрацията варира от  $3 \times 10^3$  ПМН/ml до  $6 \times 10^5$  ПМН/ml).

Намерена е линейна зависимост между пиковата стойност на ЛХЛ интензитет ( $I_{\max}$ ) и концентрацията на ПМН в пробата. Намерените зависимости са от следните видове:  $y = ax + b$  (Bass D, 1986) и  $y = ax$  (De Sole et al, 1983; Ristola M, Repo H, 1989; Ristola M, Repo H, 1990).

Бе установена линейна корелация между  $I_{\max}$  и концентрацията на ПМН от типа  $y = ax$  (виж Фиг.6). Тя е приложима за широк концентрационен диапазон на ПМН - от  $3 \times 10^3$  /ml до  $6 \times 10^5$  /ml, включващ диапазоните при високи и при ниски разреждания. Този обхват частично включва изследваните от De Sole et al, 1983 високи разреждания (отговарящи на концентрации от  $5 \times 10^3$  ПМН/ml до  $3 \times 10^4$  ПМН/ml) и от Ristola M, Repo H, 1989 за ниски разреждания

(отговарящи на концентрации от  $2.5 \times 10^5$  ПМН/ml до  $2.5 \times 10^7$  ПМН/ml).

**Фиг. 6** Корелация между  $I_{\max}$  и концентрацията на ПМН в пробата. Във вложената фигура е дадена представителна извадка от първични ЛХЛ кинетични криви, получена от проби с различна концентрация ПМН. (Точките и баровете са средните и стандартните отклонения от поне 4 измервания).



**Фиг. 7** Отношения на ЛХЛ отговори от проби с различна концентрация ПМН. Във вложената фигура е дадена представителна извадка от първични ЛХЛ кинетични криви, от които тези отношения са изчислени.

Следователно, в изследваният ПМН

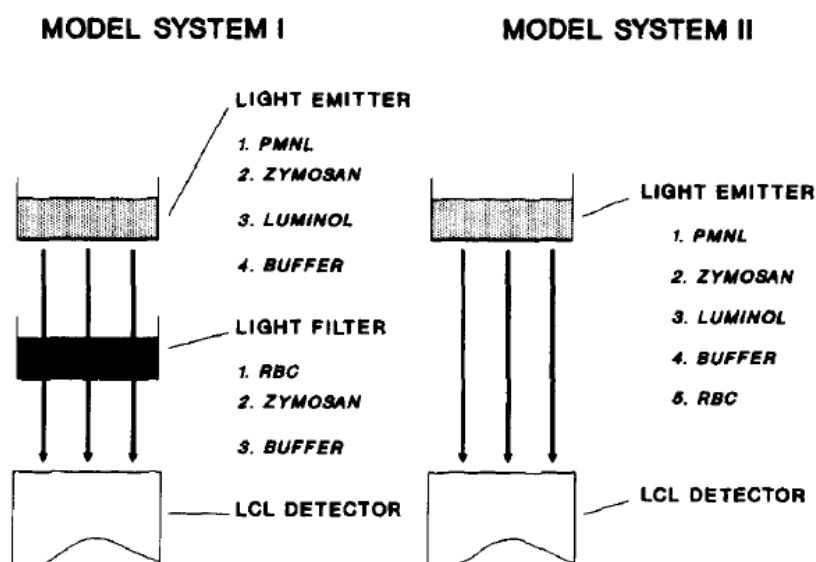
концентрационен интервал, ХЛ интензитет е пропорционален на броя ПМН не само за  $I_{\max}$ , но и за времеви интервал около него (Фиг. 7).

Влиянието на броя ПМН върху ХЛ отговор бе изследван във времеви интервал около пикът на ХЛ кинетика за концентрации от  $6 \times 10^3$  ПМН/ml до  $3 \times 10^4$  ПМН/ml. (вложената фигура на Фиг. 7). Времето за достигане до пика не зависи от ПМН концентрацията. Бе намерено, че отношението на кинетичните криви е константа във времеви интервал около пика (Фиг. 7).

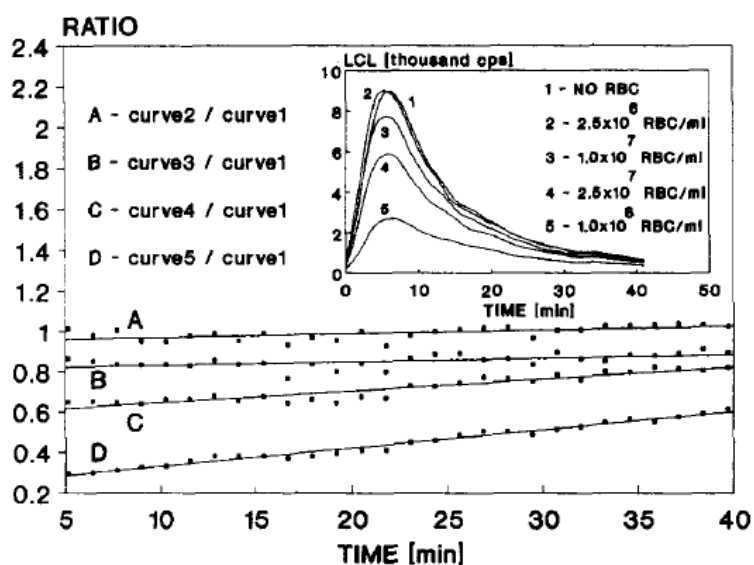
Това позволява нормализацията на първоначално записаните ХЛ кинетики по отношение на броя ПМН, в гореуказаните концентрации и времеви интервали.

### 2.3. Влияние на RBC в общият ХЛ отговор

Влиянието на RBC върху ЛХЛ кинетиката на ПМН бе изследвано с използването на два типа моделни системи. Първата моделна система се състоеше от пространствено разделени "светлинен емитер" (изолирани ПМН) и "светлинен филтър" (изолирани RBC), разположени коаксиално по отношение на ЛХЛ детектора (Фиг.8) .



Фиг. 8 Схематична диаграма на използваните моделни системи за оценка отслабването на ЛХЛ интензитета, дължащо се на RBC. (За детайли виж текста).



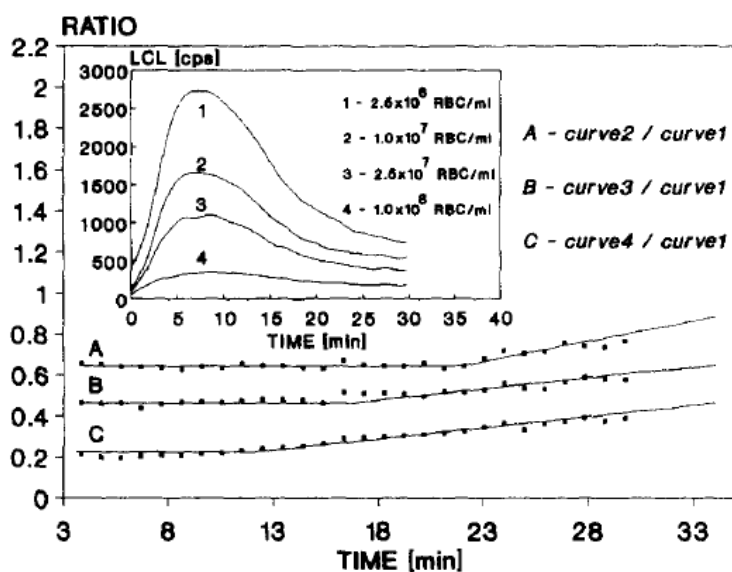
Фиг. 9 Оценка отслабването на ХЛ интензитет при преминаване през „филтри“ с различен брой RBC (използвана моделна система I – виж Фиг. 8). Отношения на ЛХЛ отговори, записани след като емисията е преминала през „светлинните филтри“, съдържащи различна концентрация RBC. (Във вложената фигура са дадени реалните ЛХЛ кинетични криви).

Zymosan стимулираните ЛХЛ отговори от  $3 \times 10^4$  ПМН/ml, записани след светлинна трансмисия през филтри с различен RBC брой (или цяла кръв) са показани на Фиг.9

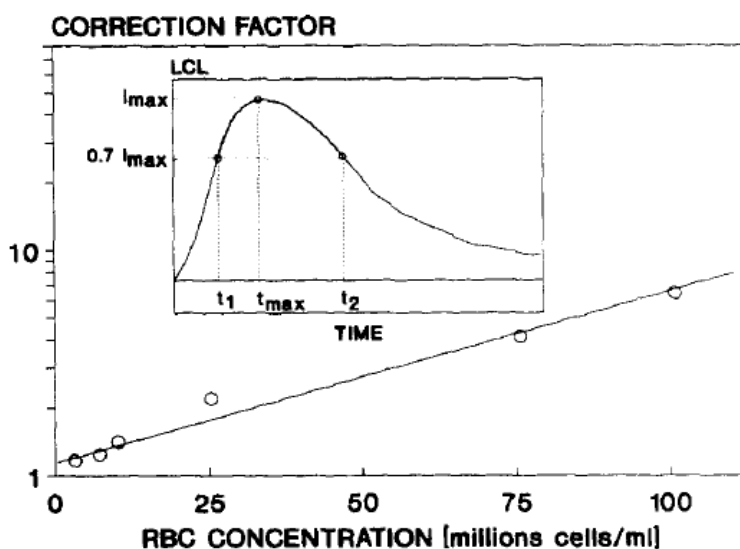
(малката фигура). Те са нормирани спрямо ЛХЛ интензитета без филтър и са представени като трендове на Фиг.9. Наблюдава се тенденция за времева независимост на RBC екстинкция на ЛХЛ кинетиката с намаляване на броя RBC.

Отношението е константа за цялото време на ЛХЛ отговора при  $RBC < 10^7$  RBC/ml, разреждане по-голямо или равно на 1: 500 (Фиг.9, крива В). Ако използваме за "светлинен филтър" разреждана цяла кръв със същото количество RBC, не наблюдавахме значими отклонения от установените зависимости. Следователно възможното участие на останалите кръвни компоненти в светлинното отслабване на RBC е незначително.

Втората използвана моделна система Model System II бе без външен "светлинен филтър" (Фиг.8). Светлинният емитер се състоеше от ПМН, Zumosan, луминол и добавки от различен брой изолирани RBC. Добавеното количество RBC съдържаше известен брой ПМН. Присъствието на левкоцитите значително повлияваше основният ЛХЛ отговор, особено в случаите на високи концентрации RBC; ето защо се наложи да се коригира ЛХЛ отговора по отношение на общият брой ПМН в пробата. ЛХЛ отговорите от  $3 \times 10^4$  ПМН/ml смесени с различен брой RBC, коригирани за общия брой ПМН в пробата са показани на Фиг.10 (малката фигура). Всяка от тези криви бе след това нормирана спрямо тази съответстваща на RBC концентрация  $2.5 \times 10^6$  RBC /ml (съответстваща на кръвно разреждане 1: 2000), за която влиянието на RBC е незначително (Фиг.10 по-долу). Наблюдават се очертани области на времева независимост на тези нормирани криви в интервали включващи пиковата стойност на ЛХЛ кинетичната крива. Колкото е по-малка концентрацията на RBC толкова е по-голяма тяхната продължителност.



**Фиг. 10** Оценка отслабването на ХЛ интензитет от присъствието на различен брой RBC в изследваната проба (използвана моделна система II – виж Фиг. 8). Отношения на ЛХЛ отговори, записани от проби, съдържащи различна концентрация RBC. (Във вложената фигура са дадени реалните ЛХЛ кинетични криви.



**Фиг. 11** Корекционен фактор (по оста Y), който трябва да се приложи върху ХЛ интензитет при различни използвани в пробата RBC концентрации (по оста X). Той е валиден за времеви интервал  $t_1 - t_2$  (виж вложената фигура). Всички точки, на базата на които е построена линейната интерполационна права, са

средни стойности от поне 9 опита.

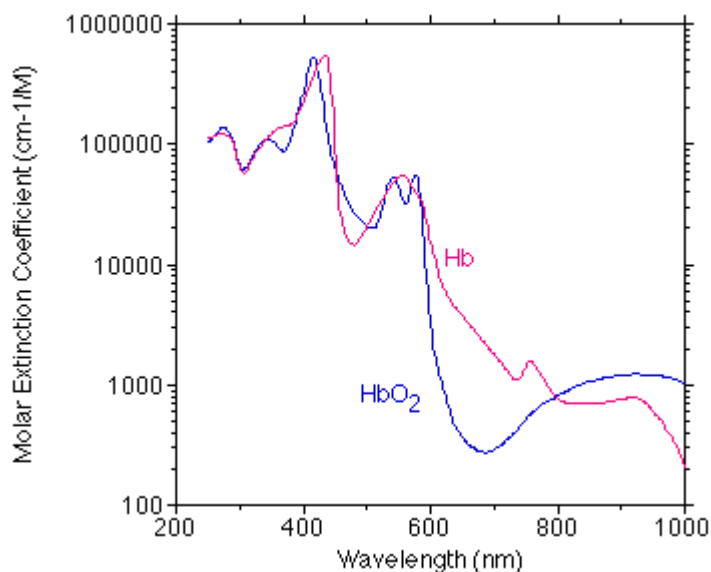
Да дефинираме относителната ЛХЛ като отношението на ЛХЛ от проба с  $2.5 \times 10^6$  RBC/ml и ЛХЛ на проба с различно количество RBC. Бе установена линейна зависимост в полулогаритмичен мащаб между относителната ЛХЛ и концентрацията на RBC в пробата в диапазона  $2.5 \times 10^6$  RBC /ml -  $10^8$  RBC /ml (Фиг. 11). Тази относителна ЛХЛ фактически е корекционния фактор, който може да бъде използван в качеството на корекция по отношение на RBC концентрацията. Обхвата на валидност на тази корекция за времеви интервал около пика се увеличава с намаляване на концентрацията на RBC. За най-високата използвана концентрация на RBC ( $10^8$  RBC /ml) тази корекция е валидна за времеви интервал около пика, съответстващ на нива  $0.7 \times I_{max}$  (вж. малката фигура от Фиг.11), но за концентрации по-малки от  $10^7$  RBC /ml може да бъде коригиран почти целият ЛХЛ отговор.

#### 2.4. Съвместно влияние на ПМН и RBC върху ХЛ отговор

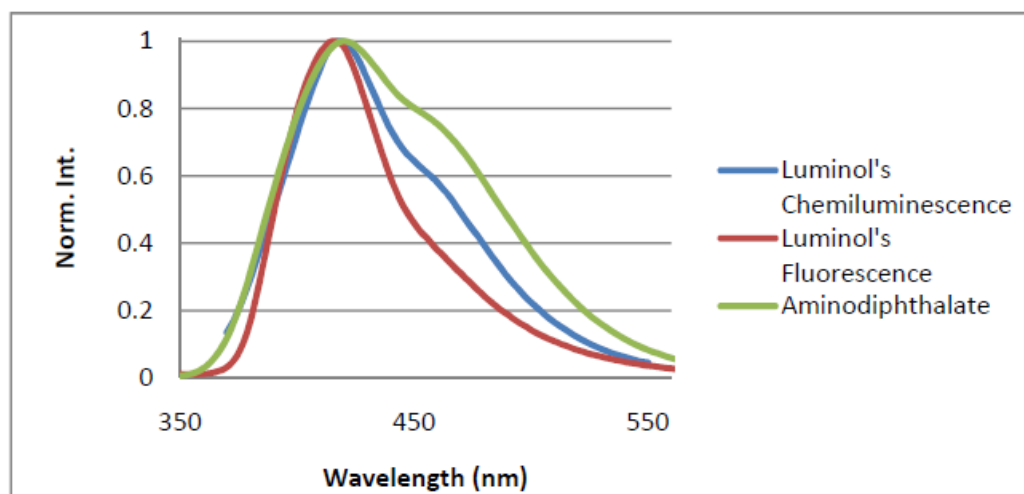
Установената линейна корелация между ЛХЛ интензитета в пика ( $I_{max}$ ) и ПМН концентрацията (виж Фиг. 6) позволява нормализация на ЛХЛ отговора в широк обхват на концентрации – от  $3 \times 10^3$  ПМН/ml до  $6 \times 10^5$  ПМН/ml. Получените кинетични криви при високи и при ниски разреждени проби с различен брой ПМН може да се сравняват по отношение на  $I_{max}$ .

За един относително тесен ПМН концентрационен диапазон - от  $6 \times 10^3$  /ml до  $3 \times 10^4$  /ml (който при използваните кръвни разреждания е по-широк от диапазона на физиологичната вариация на броя ПМН) – формата на ЛХЛ кинетичните криви около пика е еднаква. Пропорционалността на ЛХЛ отговора по отношение на броя ПМН е валидна не само в пика, но и във времеви интервали около него (вж. Фиг.7) . Установихме, че тяхната продължителност се определя на ниво  $0.7 \times I_{max}$  (виж малката фигура от Фиг.7). Такава пропорционалност очевидно не съществува в началния и крайния участъци от ЛХЛ кинетиката. Този факт е в съгласие с добре познатата не много добра корелация между пиковият ЛХЛ интензитет и „площта под кривата“, които са най-често използваните параметри. Наблюдаваната нелинейност по отношение на броят ПМН в тези части на ЛХЛ кинетиката може би се дължат на различната скорост на включване и активиране на индивидуалните ПМН в общият ЛХЛ отговор.

RBC са клетките, които основно отговарят за поглъщането на светлината излъчвана от луминола. Хемоглобинът има спектър на поглъщане (Фиг. 12), който в значителна степен покрива емисионния спектър на луминола (Фиг. 13).



**Фиг. 12** Спектри на поглъщане на хемоглобин (Hb) и HbO<sub>2</sub> (Scott Prahl, Oregon Medical Laser Center <http://omlc.ogi.edu/spectra/index.html> )



**Фиг. 13** Нормализиран хемилуминесцентен и флуоресцентен спектър на луминол, както и флуоресценция на аминофталат. Луминола е с концентрация е  $4.6 \times 10^{-2}$  М, водородния прекис е  $4.6 \times 10^{-2}$  М и калиевият персулфат -  $6.0 \times 10^{-2}$  М. (Filipe Miguel Cardoso Menezes. Synthesis and Chemiluminescence Studies of Luminol and Derivatives. 2010; Dissertation).

Докато в нашата първа моделна система RBC могат да отслабват ЛХЛ интензитет само физически, във втората би могло да се очаква един допълнителен ефект, свързан с възможни биохимични взаимодействия между RBC и други компоненти на изследваната система. Подобността на резултатите, получени с тези две моделни системи (Фиг.9 и 10) показва, че в двата случая екстинкционните ефекти на RBC върху ЛХЛ отговора се дължат основно на физически процеси - най-вероятно на светлинна абсорбция и разсейване.



Намерено е, че нормализацията на ЛХЛ отговора е константа във времеви интервал около пика. На тази основа е намерена корекция на ЛХЛ интензитет по отношение на концентрацията на RBC в този времеви интервал. Линейна корекция в логаритмична скала е намерена между корекционния коефициент за RBC и RBC концентрациите в интервала от  $2.5 \times 10^6$  RBC/ml до  $10^8$  RBC/ml. Тази корекция е валидна за времеви интервал около пика, съответстващ на ниво  $0.7 \times I_{\max}$  при най-високата използвана концентрация на RBC ( $10^8$  RBC/ml), като за концентрации по-малки от  $10^7$  RBC/ml може да бъде коригиран почти целият ЛХЛ отговор.

Установените възможности за независима корекция на ЛХЛ кинетичните криви, по отношение на броя ПМН и RBC в проба, могат да бъдат комбинирани за използване при работа с разредени целокръвни проби и от различни индивиди. Общият корекционен фактор е както следва (Bechev et al, 1993):

$$\text{Обща корекция} = \text{Корекционен фактор за RBC} / \text{брой ПМН в проба} \quad (3)$$

Такава корекция е валидна само за  $I_{\max}$  при кръвни разреждания по-големи от 1:50, което съответства на концентрации ПМН и RBC в тестваните проби по-малки съответно от  $6 \times 10^5$  ПМН/ml и  $10^8$  RBC/ml. За коригиране в по-широк времеви интервал, съответстващ на ХЛ нива  $0.7 \times I_{\max}$ , трябва да бъдат използвани кръвни разреждания по-високи от 1:200, което съответства на концентрации ПМН и RBC в проба по-малки съответно от  $3 \times 10^4$  ПМН/ml и  $10^7$  RBC/ml. Най-общо се наблюдава тенденция на увеличение на времеви интервал за приложение на общата корекция с увеличаване на разреждането (намаление концентрацията ПМН и RBC). Една и съща корекция по отношение на концентрацията ПМН за цялото време на отговора не е много коректна (виж Фиг. 7).

## 2.5. Приложение и предимства на усъвършенстваната методика за целокръвни ХЛ изследвания

Предвид предложените корекции, може да се направи обективна количествена оценка на активността на ПМН (функционалното състояние) по следния начин. Първо се намира линейната зависимост на ЛХЛ интензитет от ПМН концентрацията (виж Фиг.6) и зависимостта на корекционния коефициент от концентрацията RBC (виж Фиг.11).

Усъвършенстваната методика позволява съвместна нормировка в разширени диапазони на ПМН и RBC. Те зависят от работния режим и чувствителността на луминометъра. Изчислява се общата корекция (съгласно уравнение 3) за всяка тествана целокръвна проба, която отчита реалните различни концентрации ПМН и RBC в пробата. Този фактор трябва да се използва за корекция на ЛХЛ отговора.

Дадена е методика за корекция, с която се намира корекционен фактор не само за максималния интензитет, както досега е правено, но и във времеви интервал около времето на пика. Корекциите са намерени за по-широк диапазон разреждания (от 1:50 до 1:2000) от досега използваните. Дадена е методиката за намиране, както и този праг на разреждане, при който може коректно да се нормира и коригира за целия времеви диапазон на отговора.

ЛХЛ отговорите от силно разредени проби ще отразява активността на индивидуалните ПМН, защото в този случай взаимодействията между клетките и със плазмените компоненти са пренебрежими. ЛХЛ отговорите от слабо разредени проби ще отразява активността на ПМН в среда, близка до естествената, тоест тя ще е резултат от

съвместното действие на ПМН, RBC, плазмата и множеството компоненти (като например интерлевкините) освободени от стимулираните клетки. Допълнително предимство на този подход е, че бихме могли чрез сравняване резултатите от силно и слабо разреждени проби от един и същ пациент, правилно да оценим влиянието на останалите фактори върху ПМН отговора (освен ПМН и RBC). Създадената от нас методика (Bechev et al, 1993) е използвана и цитирана в указаните накрая на дисертацията цитирания.

### **3. Изследване влиянието на амплитудно модулирано променливо магнитно поле върху активацията на кръвните фагоцити.**

При взаимодействието на фагоцитите с патогенните микроорганизми или „чужди“ частици един от стартиращите се процеси е NOX активацията, запуска се метаболитен отговор на клетката и се генерират множество активни форми на кислорода, включително радикали (Badwey JA, Karnovsky ML, 1980). Като резултат от радикална рекомбинация, се генерират електронно възбудени молекули, които при релаксирането до основно състояние емитират фотони. Този процес се съпровожда с хемилуминесценция (Allen RC et al, 1972). Кинетиката на тази ХЛ корелира с времевият ход на радикалната формация и фагоцитна активация (Easmon CF, 1980). Теоретични съображения предполагат, че магнитното поле би могло да модифицира скоростта на радикалните реакции, поради парамагнитните свойства на свободните радикали (Halliwell B., Gutteridge J-MC, 1985). Следователно може да се очаква, че някои видове магнитни полета може да повлияват фагоцитната активация и съответно „убиването“ на бактерии.

#### **3.1 Експериментални условия**

Влиянието на амплитудно модулиране променливо магнитно поле (MF) върху функционалното състояние на ПМН е изследвано от нас (Bochev P., Bechev B., Magrisso M, 1992). Амплитудно модулираното магнитно поле бе с носеща честота 1.1 kHz, максимална амплитуда 15 mT и променяща се модулираща честота от 1 до 100 Hz за 15 s. За целта е използван апарат за физиотерапия Магнит-87 (производство фирма Авангард, България).

Две групи кювети с кръв от морски свинчета са сформирани – една контрола и втора - третирана с магнитно поле (MF) с различна продължителност. След това се измерва целокръвния ХЛ отговор при стимулация с неопсонизиран Zynosan.

#### **3.2 Влияние на магнитното поле върху активацията на ПМН**

Анализ на характеристичните параметри на ХЛ отговори е направен с цел установяване ефектите на MF върху фагоцитната активация. ХЛ отговори на zynosan стимулирани ПМН са правени съгласно описаната преди методика (Ribarov S and Bochev P, 1983). За оценка на скоростта на фагоцитната активация сме използвали параметрите "индукционен период", "начален наклон" и "време до пика". Степента на достигната активация и капацитет на стимулираните фагоцити се оценява чрез останалите два параметъра - "пик" и "площ" (виж II 10.2.2.1).

Резултатите показват (Таблица 2), че третираните с MF ПМН проявяват тенденция към увеличаване както на скоростта (намален lag time), така и на степента на достигната активация и капацитет на стимулираните фагоцити (увеличен „пик“ и „площ“). Тези ефекти зависят от продължителността на третирането.

Параметри на ХЛ отговор	Продължителност на третирането [min]		
	0	15	60
Закъснение началото на отговора [min]	12.3 ± 4.1	6.1 ± 2.1 *	3.5 ± 1.7 *
Време до пика [min]	30.2 ± 6.0	28.7 ± 5.2	29.0 ± 4.0
Пик [ $10^4$ counts / min]	37.1 ± 10.1	40.0 ± 7.9	44.8 ± 12.1 *
Площ [ $10^4$ counts]	777 ± 231	917 ± 262	1047 ± 304 *

**Таблица 2** Параметри на ХЛ отговори при различна продължителност на третирането с магнитно поле. Всички стойности са средни ± SD получени от 18 експеримента. Разликите спрямо нетретираните проби са оценени със Student's t-test \* обозначава  $P < 0.05$ , където  $P$  е ниво на значимост.

Може да се предположи, че MF въздейства на способността на ПМН да генерира кислородни радикали и/или влияе на скоростта на радикалните реакции, съпровождащи фагоцитозата и/или преструктурираните под влияние на MF на липидите в мембранните течнокристални структури. Така например е докладвано за лимфоцити, че пулсиращо електромагнитно поле повлиява процесите, участващи в преноса на сигналите от екстраселуларното пространство, вътре в клетката до клетъчния отговор (signal transduction mechanism) -  $Ca^{2+}$  входящ поток, преразпределението на повърхностните рецептори и активността на протеинкиназа C (Byus CV et al, 1984); Luben RA et al, 1984). До момента на публикацията все още нямаше добре обоснована експериментално хипотеза за механизма на въздействие. Приемат се няколко възможности: 1) – директна активация на фагоцитоза (или други активности на клетките), водещи до продукция на свободни радикали, 2) – увеличение на времето на живот на радикалите, водещо до увеличената им концентрация и 3) – увеличена активация, включваща директна стимулация на радикалната продукция (Simko M, Mattsson M, 2004). Независимо от намирането на такива теории, това не променя получените резултати.

## 4. Система за изследване на ХЛ спектър

### 4.1. Апаратен дизайн, измерване и изчисление на хемилуминесцентен спектър

#### 4.1.1. Апаратен дизайн и измерване

Луминометърът е с възможност за спектрални изследвания. Това изисква допълнителни промени в базовата част на апаратната, хардуерна и софтуерни компоненти. В резултат може псевдосимултантно да се измерва интегрално и/или спектрално хемилуминесценция, емитирана от до 6 проби в 6 спектрални диапазона, да се обработват регистрираните данни в съответствие с избрания спектрален анализ.

Към базовия луминометър е добавен спектралният селектор (4) (виж в IV 1.1.2), съдържащ интерференчни или cut-on филтри (2) и намиращ се заедно с кюветодържателя в една и съща пространствена част. Това аранжиране позволява независимо движение на дисковете с кювети и филтри, минимален оптичен път между светлинно-излъчващите проби и светлинния детектор (12) и оптимално събиране на светлината.

След установяването на изискуемите параметри за избрания режим на действие на апарата и стартиране на измерванията, кюветодържателят (5) и филтродържателят (4) започват да се въртят в съответствие с избраният режим. Кюветите и филтрите се движат и позиционират под оптимизиран компютърен контрол.

Създаденият базов софтуер контролира цялостния процес по възприемане и запис на данните от спектралните измервания. Базовият софтуер поддържа различни измерителни режими за спектрални измервания на до 6 проби и до 6 спектрални диапазона.

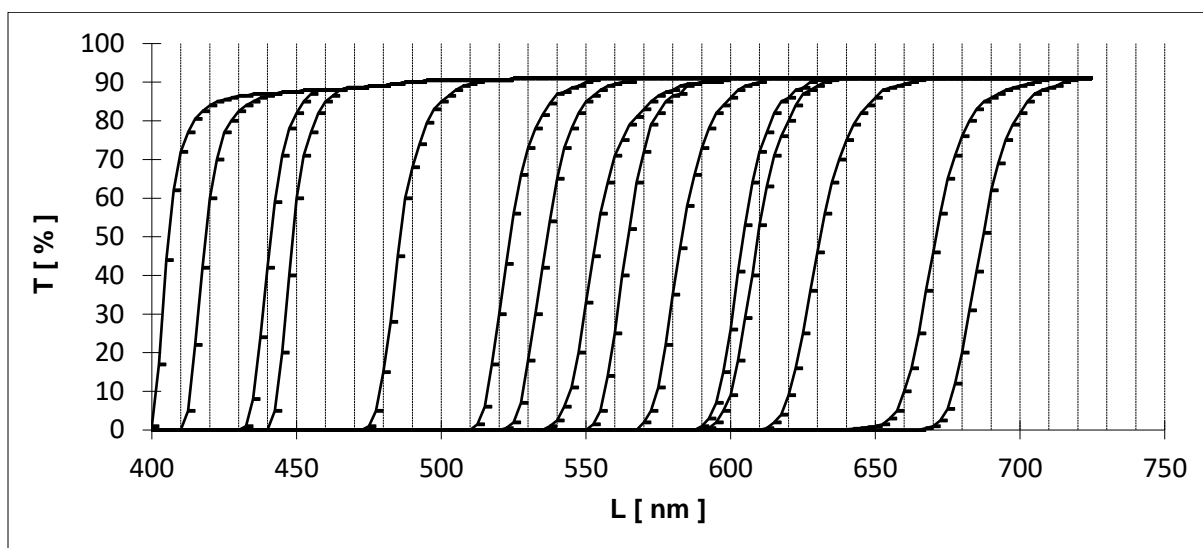
Специализирания софтуер поддържа преструктурирането на "суровите" данни за избрания тип спектрален анализ (виж IV 4.2).

Измерването на спектри при нативната клетъчна ХЛ е силно затруднено поради много слабия ХЛ интензитет. Процесите при клетъчната ХЛ се развиват сравнително бавно във времето, което позволява по-големи "броячни времена". Взети са специални мерки за получаване на достатъчно силен сигнал без загуби и високо съотношение сигнал/шум. Мерките включват използването на селектирани, чувствителни, малошумящи ФЕУ с модул за охлаждане, настройка работата на ФЕУ-то в квантометричен режим, специални камери за пробата и колектиране и отвеждане на светлината до ФЕУ с минимални загуби.

Като диспергиращи елементи при по-силни сигнали използваме интерференчни филтри, а при много слаби сигнали – „cut-on“. Трансмисионните коефициенти при „cut“ филтрите са много по-големи, в сравнение с интерференчните филтри, като се покриват по-големи вълнови диапазони, но пък излъчването на емитерите е широколентово. Основно са използвани „cut on“ филтри.

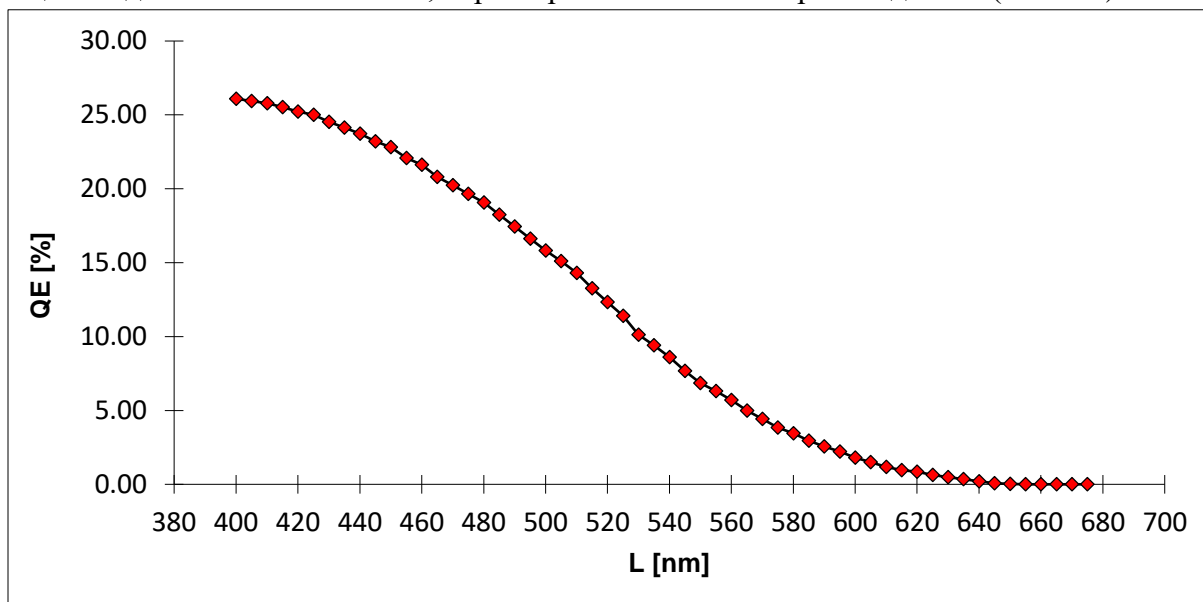
#### 4.1.2. Обработка на спектрални измервания, получени с "cut on" филтри.

Използван е набор от филтри с трансмисионни характеристики, дадени на Фиг. 14.



**Фиг. 14.** Трансмисионни характеристики на използваните филтри.  $T$  – коефициент на пропускане,  $L$  - дължината на вълната.

За използваният ФЕУ 9635QB сме използвали QE (квантовата ефективност) като функция на дължината на вълната, характеристика взета от производителя (Фиг. 15).



**Фиг. 15.** Квантова ефективност (QE) на ФЕУ - 9635QB.  $L$  - дължина на вълната.

„Суровите данни“, получени за всяка дължина на вълната, са коригирани съгласно квантовата ефективност на ФЕУ и в съответствие със съответния коефициент на пропускане на "cut on" филтър, който се използва за получаване на стойност, пропорционална на реалния интензитет при тези дължини на вълните.

Разработената методика за изчисление на излъчения от пробата интензитет  $I(\lambda)$  във вълновия прозорец, зададен от  $i$ -ят и  $j$ -ят филтри се базира на формулата:

$$I_{ij} = k \int_{\lambda_i}^{\lambda_j} I(\lambda) \cdot (T_i(\lambda) - T_j(\lambda)) \cdot QE(\lambda) \cdot d\lambda \quad (4)$$

където  $I_{ij}$  – регистриран от луминометъра интензитет в указания вълнови диапазон,  $I(\lambda)$  - интензитета на излъчването от пробата за дължина на вълната  $\lambda$ ,  $T_i(\lambda)$  –

коэффициент на пропускане на  $i$ -ят филтър,  $T_j(\lambda)$  – коэффициент на пропускане на  $j$ -ят филтър,  $QE(\lambda)$  – квантова ефективност на ФЕУ, кофициента  $k$  не се знае, но зависи от абсолютната квантова ефективност на ФЕУ, ефективността на колектиране на фотоните от оптичната система и др. Тъй като работим с относителни величини, то стойността на  $k$  не е нужна (съкращава се).

Направена е нормализация на  $I_{ij}$  с цел сравняване на спектралната емисия в различните моменти време от развитието на кинетиката, и да може да сравняваме спектрите при различни опити, както и да оценяваме относителния дял на емисията от различни емитери (5)

$$norm I_{ij} = \frac{I_i - I_j}{\frac{\lambda_j}{k \int (T_i(\lambda) - T_j(\lambda)) \cdot QE(\lambda) \cdot d\lambda} \cdot [\sum \frac{\lambda_n}{\lambda_m} \int (T_i(\lambda) - T_j(\lambda)) \cdot QE(\lambda) \cdot d\lambda]}$$

Където  $norm I_{ij}$  е интензитета на излъчването от пробата в спектралния прозорец  $\lambda_i - \lambda_j$ ;  $I_i - I_j$  регистрирания интензитет през филтър  $i$  и  $j$  съответно; останалите означения са както в предната формула, и сумата ( $\sum$ ) в знаменателя на равенството е сума от величините взети при всички съседни филтри до изчерпване използваният набор от филтри, който покрива спектралния диапазон на ФЕУ.

## 4.2. Видове спектрални кинетични анализи и симултантност

### 4.2.1. Видове анализ на спектрални кинетични данни с нашата апаратура.

Измереният ХЛ интензитет  $I$  зависи от: момента на измерване  $t$  (в развитието на процесите, по време на опита); измерваната дължина на вълната  $\lambda_j$  (или спектралния прозорец  $\Delta\lambda_j$  - определяни от нас с оптичното пропускане на филтрите и квантовата ефективност ( $QE$ ) на ФЕУ за съответните дължини на вълните) и зависещи от емитерите на ХЛ; както и от зададени от нас параметри  $p_i$ , влияещи развитието на ХЛ процес в изследваните проби. Такива параметри могат да бъдат концентрации на различни добавени вещества в пробите, рН, температура, физично въздействие с няколко нива на параметър, характеризиращ го, няколко въздействащи фактора и др. (6)

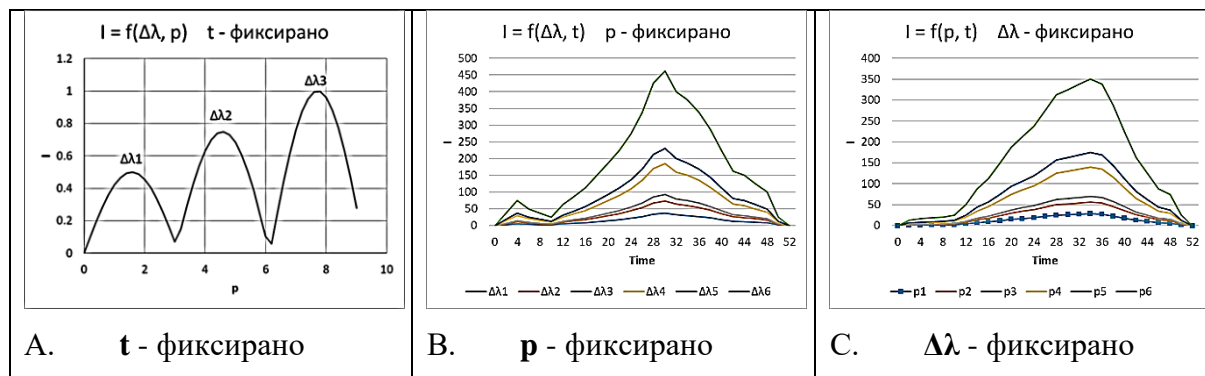
$$I = f(p_i, \lambda_i, t) \quad (6)$$

Трудно се работи в 4 мерно пространство, което ни дава горната формула. По-долу ще дадем редуциране на размерността на пространството и някои примерни приложения.

При фиксиране на една от трите променливи –  $p$ ,  $\lambda$  или  $t$ , то се получава математическа формула на повърхност. Но тъй като  $p$  и  $\lambda$  са дискретни променливи с 1 до 6 стойности, то вместо повърхност се получава семейство криви. В зависимост от целите на изследването, се избира съответното семейство криви, при съответно фиксирана трета променлива. Например:

1) Нека фиксираме параметъра  $t$  – избран момент от времето развитие. Зависимостта на ХЛ интензитет  $I$  от фактора  $p$  в избрани от нас  $n$  спектрални диапазони  $\Delta\lambda_1, \Delta\lambda_2, \dots, \Delta\lambda_n$  (определени от комбинациите оптични филтри) (7), могат да бъдат визуализирани като семейство криви (Фиг. 16-А).

$$I = f(\Delta\lambda, p), t \text{ е фиксирано} \quad (7)$$



**Фиг. 16 – А.** Зависимост на ХЛ интензитет  $I$  от параметъра  $p$  в избраните  $n$  спектрални диапазони  $\Delta\lambda_1, \Delta\lambda_2, \dots, \Delta\lambda_n$  в избран фиксиран момент ( $t$ ) от развитието на процесите, водещи до ХЛ емисия. **В.** Зависимост на ХЛ интензитет  $I$  от времето  $t$  в  $n$  интересни спектрални диапазони  $\Delta\lambda_1, \Delta\lambda_2, \dots, \Delta\lambda_n$  за един фиксиран фактор (една кювета ( $p$ )). **С.** Зависимост на ХЛ интензитет  $I$  от параметъра  $p$  във времето  $t$ , в фиксиран избран от нас интересен вълнови прозорец ( $\Delta\lambda$ ).

Нека момента от време  $t_{\max}$  е този, за който  $I = I_{\max}$  на интегралният интензитет при развитието на ХЛ отговор на стимулираните ПМН, а  $\Delta\lambda_2$  (620-650 nm) и  $\Delta\lambda_3$  (680-720 nm) съответстват на максимума на бимолекулна емисия на синглетен кислород при 634 nm и при 703 nm, а параметъра  $p$  е рН на средата. От графичното представяне на резултатите може да направим извода, че първият преход при 634 nm е водещ при рН 4.6, а вторият – при рН 7.8. [измислена ситуация]

2) Нека фиксираме параметъра  $p$ , тоест снемеме емисионния спектър от една избрана кювета. Зависимостта на ХЛ интензитет  $I$  от времето  $t$  в избрани от нас  $n$  спектрални диапазони  $\Delta\lambda_1, \Delta\lambda_2, \dots, \Delta\lambda_n$  (определени от комбинациите оптични филтри) (8), могат да бъдат визуализирани като семейство криви (Фиг. 16-В).

$$I = f(\Delta\lambda, t), \quad p \text{ е фиксирано} \quad (8)$$

Този тип анализ е удачен например за установяване кои емитери са доминантни (впредвид семейството криви с параметър  $\Delta\lambda_i$ ) и през кой период от време е това.

3) ХЛ интензитет  $I$  може също да бъде третиран и като функция на параметъра  $p$  във времето  $t$  (9). Избрали сме фиксиран интересен вълнови прозорец ( $\Delta\lambda$ ), който например съответства на емисията на карбонилните производни при диоксетановия механизъм на ХЛ емисия (350-480 nm). Тогава може да кажем кой фактор  $p_i$  указва най-голямо влияние на тези емитери (Фиг. 16-С).

$$I = f(p, t), \quad \Delta\lambda \text{ е фиксирано} \quad (9)$$

4) При фиксирани два параметъра, се получават уравнения на криви (10a,b,c):

$$I = f(t) \quad p \text{ и } \Delta\lambda \text{ са фиксирани} \quad (10a)$$

$$I = f(\Delta\lambda) \quad p \text{ и } t \text{ са фиксирани} \quad (10b)$$

$$I = f(p) \quad \Delta\lambda \text{ и } t \text{ са фиксирани} \quad (10c)$$

Това всъщност е една от кривите от съответното семейство криви в 1), 2) и 3) с аналогичен смисъл.

От тези комбинации с фиксирани 1 или 2 параметъра, със съответни семейства от криви, избираме подходящият анализ, в зависимост от целите на експеримента.

#### **4.2.2. Видове спектрални кинетични анализи и симултантност.**

"Симултантното" приемане на данни е само едно приближение, чиято валидност зависи от времевите връзки, определени от режима на работа (брой кювети и филтри за сканиране, броячно време и скорост на въртене на кюветодържателя), както и от скоростта на изследвания процес (Бечев и съавтори, 1992).

Записаните сурови данни с помощта на компютърната програма може да се групират в съответствие с желания тип анализ (виж предната точка) и да бъдат оценени доколкото е изпълнено приближението за симултантност на измерванията със съответния анализ и да се направи допълнителна компютърна обработка за симултантност с помощта на интерполационен кубичен сплайн (Bochev P., Bechev B, 1988), даващ данни за момент, който не е измерван, но който ни е нужен за симултантността.

По този начин може да се направят псевдосимултантни паралелни анализи.

#### **4.3. Изследване спектъра на нативна клетъчна ХЛ от Zymosan стимулирани ПМН.**

Въпреки, че понастоящем активираната ХЛ е широко използвана за оценка активността на изолирани ПМН и тези в цяла кръв, все още не е напълно изяснен механизмът, чрез който клетъчната система на ПМН достига до окисление на луминола и точната информативна стойност на метода. Регистрира се продукцията на различни кислородни и радикални форми, без да е възможна добрата дискриминация между тях.

При нативната хемилуминесценция – главно при реакции между АФК и двойните връзки на съединения в бактериите или клетъчните мембрани и се предполага, че в крайна сметка се генерират основно възбудени карбонилни производни, които при релаксация излъчват фотони. Вероятно индиректно синглетния кислород също има принос към ХЛ. Налично е и МРО-катализирано окисление на тирозинови и триптофанови групи, участващо в процесите на ХЛ.

Изучаването на нативната тотална ХЛ и нейния емисионен спектър дава информация за природата на процесите, свързани с процесите на фагоцитоза и генерация на активните форми на кислорода, участващи в бактерицидния ефект на фагоцитиращите клетки – информация, неизкривявана от добавяните екзогенни субстрати – физични и химични активатори. Проблемът е, че сигналят е изключително нисък, а това води до използване на "cut on" или "cut off" стъклени филтри, чрез които се реализират много големи спектрални прозорци – от порядъка на 10-30 nm, което води до сравнително големи грешки. Впредвид и на голямото усилване, което прави примерно луминола – повече от 1000 пъти, то активираната ХЛ на практика се наложи.

#### **4.3.1. Оптимизация на метода за спектрални луминесцентни изследвания**

Предвид свръхслабият сигнал, условията – разреждане на кръвта, концентрация на Zymosan, както и интегриращо време (предвид скоростта на промяна на ХЛ интензитет) са оптимизирани за получаване на оптимален максимален сигнал.



Спектралните луминесцентни изследвания са извършвани в система, състояща се от цяла кръв, стимулант - опсонизиран Zymosan и модифициран Кребс-Рингеров фосфатен буфер.

#### 4.3.1.1. Влияние на ПМН, RBC и плазмените компоненти върху клетъчната ХЛ в цяла кръв

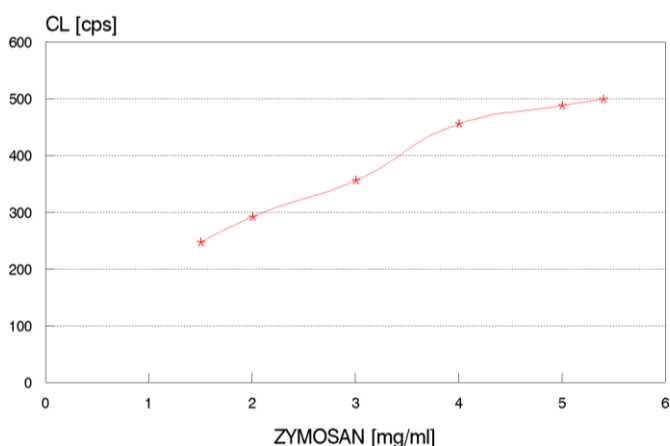
Очевидно е, че с намаляване на разреждането се увеличава респективно броят ПМН в пробата, който би допринесъл за по-голям ХЛ отговор. Еритроцитите осъществяват физическо поглъщане на излъчената светлина и сравнително слабо взаимодействуват с  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2$  и другите генерирани от ПМН радикали.

Останалите компоненти на кръвта (белтъци, липиди и др.) могат да влияят върху големината, формата и спектралния състав на отговора: чрез промяна на колоидността и вискозитета, чрез скавенджиране и/или физическо гасене и като компоненти, подлежащи на окисление.

#### 4.3.1.2. Избор на стимулант, буферна среда, температура и кръвно разреждане

Избран е Zymosan като стимулант и субстрат за окисление, предварително опсонизиран и лиофилизиран. Zymosan позволява да се отключи пълния капацитет на ПМН, а предварителната опсонизация позволява да се избегне влиянието на опсонизацията по време на експеримента. Избран е модифициран Кребс-Рингер фосфатен буфер - среда, в която въз основа на опитите ни с луминолова хемилуминесценция жизнеспособността на ПМН достига над 10 часа.

Температурата се поддържа  $37^\circ\text{C}$  - естествената за тяхното нормално функциониране. Предвид на съображения за влиянието на компонентите в пробата върху хемилуминесцентният отговор и условията на измерване са поставени няколко опита. Зависимостта на максималния интензитет в изследвания от нас диапазон на концентрации Zymosan е представена на Фиг. 17.



**Фиг 17.** Зависимост на максималния хемилуминесцентен интензитет на стимулирани ПМН от зимозановата концентрация (представителна крива от 4 експеримента).

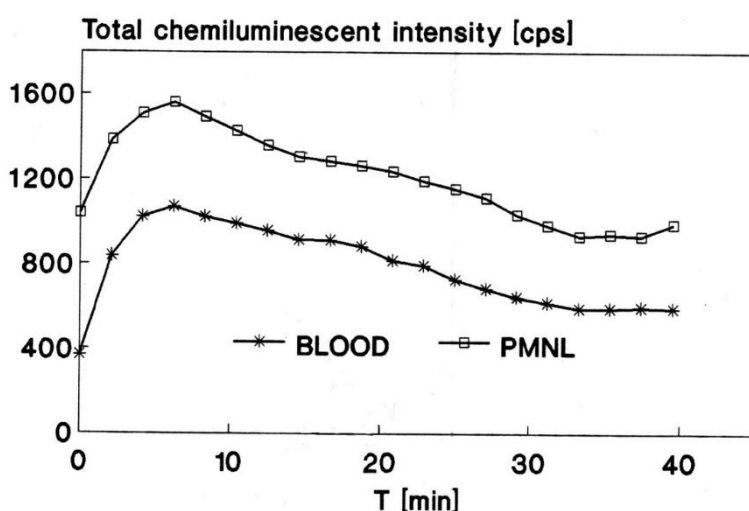
Избираме концентрация Zymosan равна на  $5 \text{ mg/ml}$ , даващ максимален интензитет, като оптимална за възбуждане на целият потенциал на отделния гранулоцит и стартиране на отговора на всички клетки от популацията, способни да реагират на стимула.

Съществува оптимум на кръвното разреждане - около  $1/10$ , при който увеличаването на ХЛ отговор, дължащ се на увеличеният брой ПМН ще доминира над гасенето, предизвикано от RBC и компонентите на кръвната плазма.

### 4.3.2. Нативни хемилуминесцентни отговори от Zymosan стимулирани изолирани ПМН и левкоцити в цяла кръв.

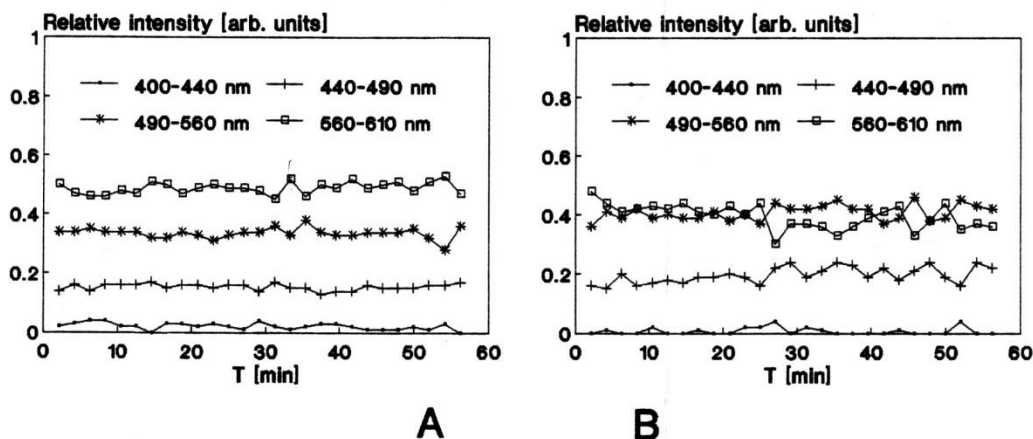
На базата на разработените методики за обработка на спектрални хемилуминесцентни данни са изследвани два типа системи - стимулирани със Zymosan изолирани ПМН и левкоцити в цяла кръв.

Хемилуминесцентните кинетични криви на интегралният отговор от ПМН в цяла кръв и при изолирани левкоцити имат подобна форма с еднакво време на достигане на максималния интензитет (Фиг. 18.). Това предполага, че подобни процеси се развиват и в двата случая по време на генерацията на АФК, макар че в двете системи има различна среда – в единия само буфер, а във втория – буфер и всички кръвни компоненти. Това вероятно е така, защото основно процесите са във фаголизозомата (с “рецепторно закопчаване”) и там няма еритроцити и количествата плазмени белтъци са минорни.



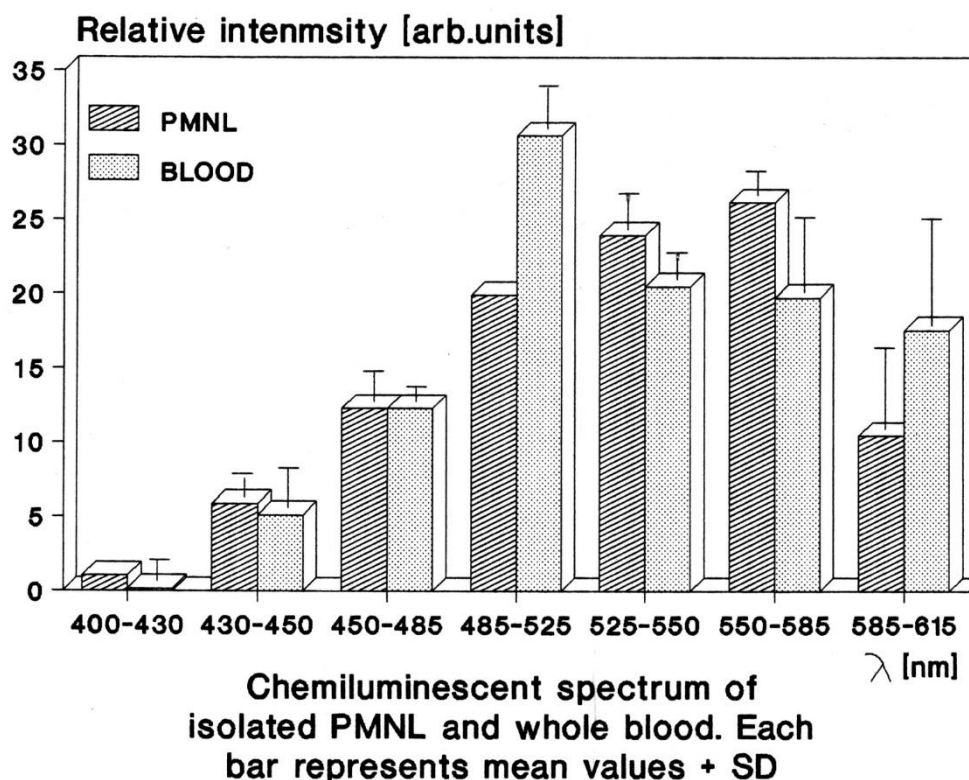
**Фиг. 18** Кинетика на интегралния ХЛ отговор от ПМН в цяла кръв и при изолирани левкоцити (представителни криви от 5 експеримента).

Относителният дял на емитираната светлина в изследваните спектрални ленти е временно независим както за изолираните левкоцити, така и в целокръвната изследвана система (Фиг. 19). Следователно емисионният спектър е приблизително един и същ във всеки един момент от ПМН отговора. Това предполага, че процесите, водещи до ХЛ емисия водят до приблизително равни относителни концентрации на емитерите по време на всички стадии от развитието на отговора.



**Фиг. 19** Кинетика на относителните ХЛ интензитети от изолирани ПМН (А) и цяла кръв (В) в дадените спектрални интервали (представителни криви от 5 експеримента).

Анализирайки целокръвния хемилуминисцентен спектър и този от изолирани ПМН, можем да направим още заключения (Фиг. 20):

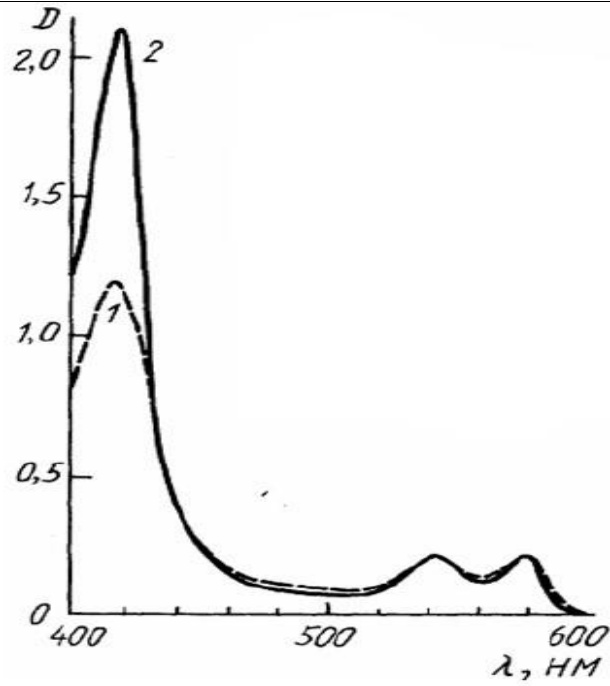


**Фиг. 20** ХЛ спектър в дадените спектрални прозорци от Zymosan стимулирани изолирани ПМН и от цяла кръв (средна стойност и стандартно отклонение от 5 експеримента).

1. Емитираната светлина от двете системи с малка дължина на вълната - 400 - 490 nm е по-малка в сравнение с останалата част от спектъра. На пръв поглед изглежда, че делът на емисията в този обхват е малък. Възможни емитери в този диапазон са възбудените карбонилни групи, излъчващи при дължини на вълната от 350 до 480 nm (Foote CS et al., 1976).

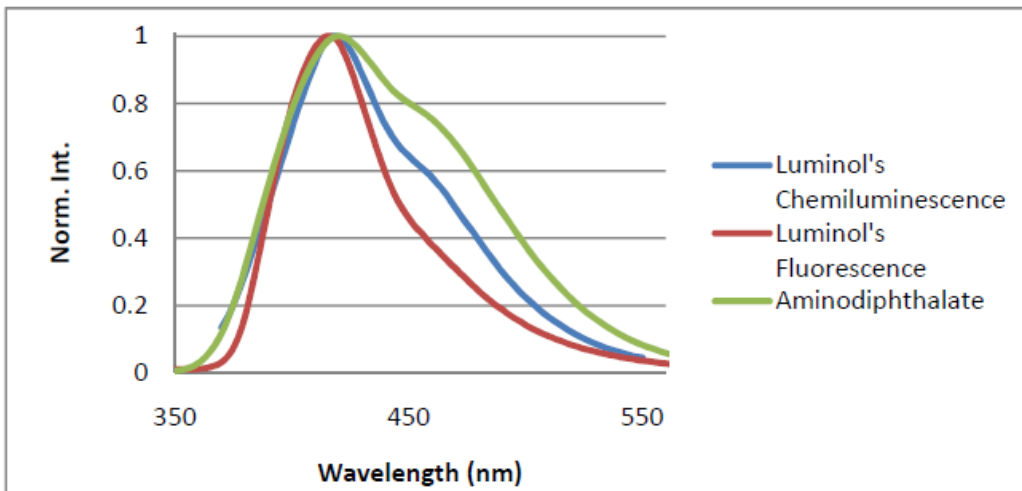
Приносът на възбудените карбонилни групи към целокръвната емисия е много голям, в предвид факта, че част от реалната емисия се абсорбира от окси- и дезокси-хемоглобина на еритроцитите в диапазона, включващ абсорбционния максимум 412 nm (при оксихемоглобина) и 430 nm (при дезоксихемоглобина) (Артюхов В, Путинцева О, 1988). Делът на MetHb в норма е много по-малък, от порядъка на 3 % (Umbreit J, 2007). Той също поглъща в областта 350 - 480 nm (с максимум при 405 nm) и има един много по-малък характеристичен пик на абсорбция при 630 nm. Все пак използваме RBC клетъчна суспензия, в която нещата са много по-сложни, в сравнение с абсорбцията от чисти Hb разтвори.

Бе оценена приблизително реалната емисия в този диапазон, предвид само физическото поглъщане от RBC (Фиг. 21, А). За база на анализа ще използваме получените от нас спектрални данни, получените от нас резултати за корекция на тоталната ХЛ в зависимост от броя RBC в пробата, спектралната оптичната плътност на RBC суспензия и емисионния спектър на луминола (Фиг. 21).

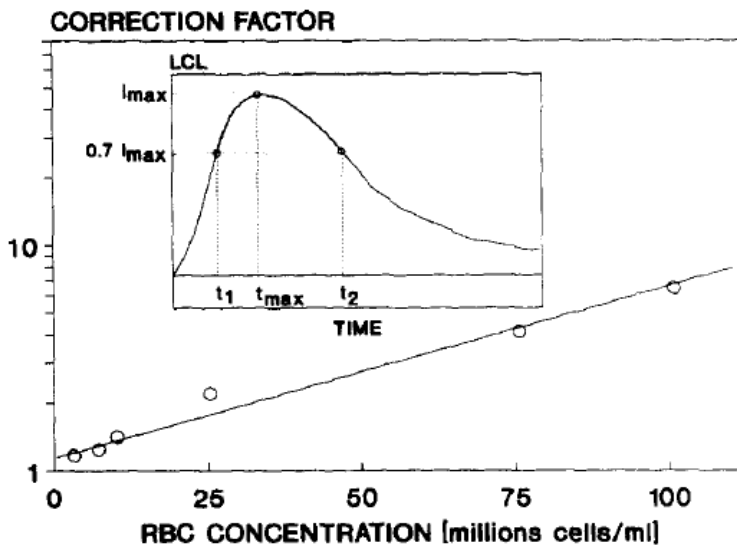


A

Спектър на поглъщане на RBC суспензия (1) и спектър на поглъщане на хемолизираните RBC (2). D е оптична плътност.



B



Фиг. 21 C

**Фиг. 21** Спектрална оптичната плътност на RBC суспензия (А), емисионен спектър на луминол (В) и получените от нас резултати (виж IV, 2.3) за корекция на тоталната ХЛ в зависимост от броя RBC в пробата (С).

При определянето на корекционния фактор за RBC при експериментите (виж IV 2) се използва луминолова ХЛ. Тоест емитера е единствен, химическия активатор Луминол, със спектралната емисионна характеристика, показана на Фиг. 21, В. Тогава намерихме, че зависимостта е експоненциална (линейна в полулогаритмичен мащаб) и основно се дължи на физическата абсорбция от RBC. Следователно гледаме емисионната характеристика на Луминола и спектъра на поглъщане на RBC суспензията. В интересувания ни интервал 400-480 nm основната емисия на луминола се покрива със спектъра на поглъщане на RBC суспензията. Следователно в първо приближение за корекция за RBC и при нативната ХЛ система може да използваме корекцията, дадена на Фиг. 21, С за интересувания ни вълнови прозорец.

Да изведем формула, даваща промяната на някакъв емисионен дял в зависимост от корекцията за RBC.

Нека **A** е относителният некоригиран за RBC емитиран дял в спектрален диапазон  $\Delta\lambda_i$ , **a** е емисията в този  $\Delta\lambda_i$ , **c** е емисията от останалия спектър, тоталната емисия е **c+a**. Тогава **A=a / (c+a)**.

Нека **B** е относителният коригиран за RBC емитиран дял в спектрален диапазон  $\Delta\lambda_i$ , **k** е корекцията от фиг. 21, С за съответната RBC концентрация. **k\*a** е коригираната за RBC емисия в този  $\Delta\lambda_i$ , **c** е емисията от останалия спектър, тоталната емисия е **c+ k\*a**. Тогава **B= k\*a / (c+ k\*a)**.

От **A=a / (c+a)** следва **c = a(1-A) / A** . Заместваме **c** в израза за **B**. След преобразуване:

$$1/B = 1 + 1/kA - 1/k \text{ следва } B = 1 / (1 + 1/kA - 1/k )$$

Трябва да използваме екстраполация, и приемаме за **k** стойност – 10. С увеличаването на **k** (възможно е да е по-голяма), и тогава делът на емисията в този спектрален прозорец би бил по-голям.

Тогава, ако в емисионния спектрален прозорец на карбонилните производни 350-480 nm вземем стойности от 5 до 15 % (трансмисионните характеристики не са правоъгълни), то след корекцията се получава емисия от 34% до 64 %. Това, показва, че при нативната ХЛ в цяла кръв се получава значителен дял, който най-вероятно се дължи на перексидното окисление на мембранните липиди на RBC, при което се образуват пероксидни радикали и впоследствие възбудени карбонилни производни, които при релаксация емитират във видимата област от 350 до 480 nm (Foote CS et al., 1976).

ХЛ при целокръвните и при изолираните ПМН има два дяла – вътреклетъчна, във фаголизозомите, и екстра клетъчна ХЛ. Вътреклетъчният дял се дължи на взаимодействието на продуцираните от ПМН радикали, получени при респираторния взрив от NADPH-оксидаза (NOX) в ПМН - супероксидни радикали, както и производните водороден перексид, синглетен кислород; активния хипохлорид, получен от МРО (отделена при дегранулацията от пероксидазо-позитивните азурофилни гранули) – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Cl системата; генерираните активни форми на азота – пероксинитрита, и други. Участниците и в двете системи са еднакви – активирания ПМН и зимозановите частици. Затварянето на фаголизозомата е плътно (зимозана е предварително опсонизиран и фагоцитирането му е чрез рецепторен механизъм) и поради това на практика участниците са само гореизброените. Това води до приблизително еднаква ХЛ емисия и

при двете системи. Тя е приблизителна, тъй като изолираните ПМН в известна степен се активират при изолацията (преминават в малко по-различно, активирано функционално състояние). ХЛ е основно вътреклетъчна. Делът на екстра-клетъчната ХЛ е значим при използваните съотношения ПМН-зимозанови частици.

Какво става в екстрацелуларното пространство? Там дифундира NOX генерираният супероксид, при дисмутацията му се образува водороден прекис и синглетен кислород, а при участието на  $Fe^{3+}$  или хем - хидроксилен радикал. Супероксида, взаимодействайки с водородния прекис, може да генерира изключително реактивния хидроксилен радикал, който инициира прекисно окисление на липиди (ПОЛ).

В статията на Cluster S et al, 1984 за първи път е доказана линейна връзка между Zymosan активирани ПМН въздействащи върху RBC (както при нашата система) и краен продукт на ПОЛ – MDA (Malondialdehyde). ПМН в диапазона  $3 - 24 \times 10^6$  cells/ml генерират в RBC MDA от 8.0 до 29.0 nmol MDA/g haemoglobin. RBC клетките са фиксирани в пробата -  $3 \times 10^9$  cells/ml. Смята се, че ПОЛ на RBC са пре-хемолитични събития (Vabior VM, 1981).

Активираният ПМН може да доведе до хемолиза на RBC (Weiss S, 1980). При хемолизата на RBC (потенциално 1 ПМН може да лизира до 10 RBC) се отделя свободен Нб. Съществуват пътища, при които отделения Нб встъпва в окислителни реакции, водещи до АФК, отделяне както на активно  $Fe^{3+}$ , така и активни хем-комплекси (Rifkind JM, Mohanty JC et al, 2014; Kanias T et al, 2014). Последните си взаимодействат с водороден прекис и се образуват хидроксилни радикали и се иницира ПОЛ в мембраната на RBC.

2. Изолираните левкоцити и целокръвната емитиращи системи имат близки лентови спектри, с изключение на диапазона 400-490 nm, което обяснихме в предходната точка. Следователно, емитерите в останалите диапазони и в двата случая са подобни или идентични. Тъй като разликата между двете системи е в различното обкръжение на клетките, може да се заключи, че околната среда не влияе силно на качествения състав на емитерите в диапазона над 490 nm.

3. Основната част от емитираната светлина е с дължини на вълните над 485 nm и при двете изследвани системи.

RBC оказват по-слабо намаление на ХЛ интензитет в този вълнов диапазон, тъй като абсорбционните максимуми при оксигемоглобина (542 nm и 576 nm) и при дезоксигемоглобина (555 nm) са значимо по-малки (Артюхов В, Путинцева О, 1988).

Не са регистрирани значими емисионни максимуми при  $\lambda = 634$  nm и 701 nm в спектъра на изолирани ПМН (Ushijima Y, Nakano M, 1980) и при  $\lambda = 1270$  nm в myeloperoxidase- $H_2O_2$ -Cl - системите (Kanofsky JR, 1984), което предполага, че синглетния кислород не участва активно и директно в емисията. Той може индиректно да участва, чрез иницирането на вторични реакции и последваща хемилуминесценция с  $\lambda > 500$  nm (Cheson B et al, 1976). Други възможни процеси и емитери в този емисионен вълнови прозорец са МРО-катализираното окисление на тирозинови и триптофанови групи.

Направеното заключение за сравнително близкия качествен състав на емитерите при двете изследвани системи, то направените предположения за възможните емитери в диапазона над 490 nm при изолираните ПМН, ще са в сила и при целокръвната хемилуминесценция.

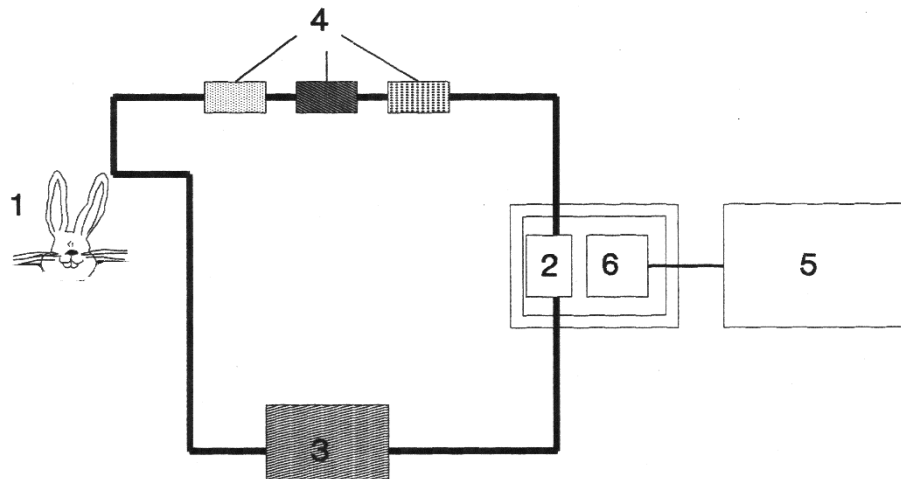
## 5. Разработване на система за *in vivo* / *in vitro* мониторинг на хемилуминесценцията в кръвен поток.

Няма промишлени апарати за мониторинг *in vivo* и *in vitro* на излъчвана хемилуминесценция в кръвен поток. Ето защо би представлявало голям интерес, особено *in vivo*, изведено екстракорпорално кръвообращение със съответната апаратна хемилуминесцентна част.

Познатите ХЛ апарати и методи са трудно приложими за директни *in vivo* изследвания. Предлаганият начин на изследване позволява въздействие на пробата с различни физични фактори без влияние върху ХЛ измервателни системи, защото те са поставени пространствено разделни. Процесът на изследване в пробата протича *in vivo*. Това позволява да се въздейства на кръвта и/или на част или на цялото опитно животно с избран фактор: електрично или магнитно поле, йонизираща радиация, инфра или ултразвук, активни вещества и други.

### 5.1. Принципна схема на системата за *in vivo* / *in vitro* мониторинг на хемилуминесценцията в кръвен поток.

Принципната схема на системата е показана на Фиг.22. От артерия на експерименталното животно (Фиг. 22 - 1), посредством тefлонова канюла, част от кръвната циркулация се извежда извън тялото. Артериалната кръв тече екстракорпорално и преминава през измерителна кювета (Фиг. 22 - 2), в която се мониторира емитираната луминесценция. След това кръвта преминава през друга (или други) кювета/и (Фиг. 22 - 3), където тя може да бъде подложена на въздействие с физически фактор (или фактори) и през серия датчици (Фиг. 22 - 4) и накрая тя се връща в съответна вена.



**Фиг. 22** Принципна схема на система за *in vivo* мониторинг на хемилуминесценция в кръвен поток. 1 - артерия на експерименталното животно, 2 – кювета, която се „гледа“ от фотоелектронния умножител, 3 - кювета подложена на въздействие с физически фактор, 4 – датчици, 5 - фотометрична апаратура, 6 - фотоелектронен умножител.

Тази хемилуминесцентна апаратура може също да бъде използвана по аналогичен начин за *in vitro* изследвания с различни видове проби. В този случай вместо опитното животно в циркулацията се включва една смесителна камера и перисталтична помпа.

Хемилуминесцентната емисия се детектира посредством фотометрична апаратура (Фиг. 22 - 5). Фотоелектронният умножител (Фиг. 22 - 6) и измерителната кювета са оптично свързани в една светонепроницаема камера. Светлината излъчена по време на луминоловото окисление, преминава през кюветната стена и се детектира от фотоелектронния умножител.

Конструкцията на втората кювета (Фиг. 22 - 3) е в съответствие с характера на физичния фактор, посредством който се извършва въздействието.

## **5.2. Трудности при реализацията на *in vivo* и *in vitro* проточните системи и анализа на получените данни.**

### **а). Трудности при реализацията на кръвния поток**

Наблюдавахме трудности при осъществяване на непрекъснатостта и постоянният поток на екстракорпоралното кръвообращение. Те произтичат от контракцията на кръвоносните съдове и получаването на "кръвни съсиреци", спираци кръвотока. Това налага прецизен подбор на премедикацията и на интравенозно вкарания хепарин.

### **б). Трудности при анализа на получените данни.**

Основните фактори, влияещи смущаващо на регистрираната луминолова хемилуминесценция са променливата концентрация на RBC, непостоянната скорост на кръвния поток и променливото кислородно насищане.

- проблеми при опити с едно животно

Спонтанният и стимулиран целокръвен хемилуминесцентен отговор на левкоцитите в кръвта би могъл да се сравнява във времето, използвайки за контрола статуса преди въздействието. Тъй като опита се прави с едно животно и обикновено въздействието независимо дали е физичен фактор, лекарство или др., обикновено не променят концентрацията на RBC и кислородното насищане, то би трябвало да се отчита и/или контролира само кръвния поток.

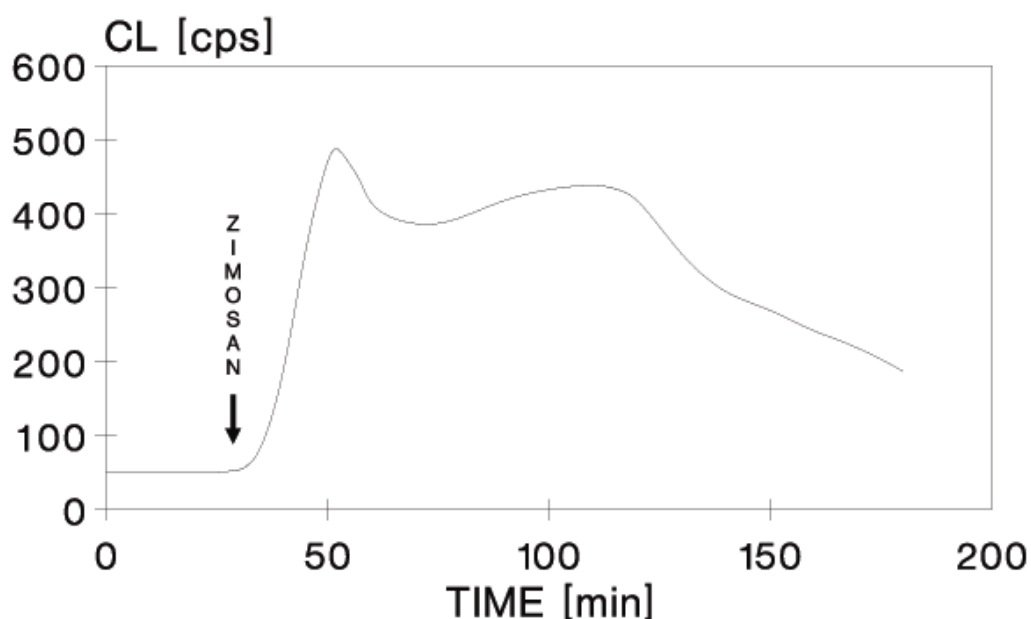
- проблеми при опити с група(и) животни

В този случай нещата са значително по-сложни и дисперсията в хемилуминесцентните отговори, дължаща на гореспоменатите фактори ще е значителна, което би попречило на отделяне влиянието на изследвания фактор, ако той влияе слабо. Решение на проблема е нормировка от типа, който показахме при анализа на сенсibiliзираната целокръвна хемилуминесценция, но със значителни ограничения, в предвид на факта, че не може да разреждаме кръвта.



### 5.3. In vivo мониториране Zymosan стимулирана хемилуминесценция в кръвен поток

Като апробация на описания методологичен подход сме снели кинетиката на луминоловата луминесценция (Фиг. 23) заснета in vivo в кръвния поток на заек по време на фагоцитоза на Zymosan от ПМН.



**Фиг. 23** Кинетика на луминолова хемилуминесценция, заснета in vivo в кръвния поток на заек след инфузия на болус със Zymosan (представителна крива от 3 експеримента).

Както вече отбелязахме в обзора, се ревизира ролята на ПМН, както във вродения, така и в придобития имунитет. Увеличава се значимостта на ПМН при вътреклетъчното елиминиране на микроорганизми, и при прогресирането и метастазирането на туморите. Някои автори смятат, че ПМН имат „диригентска” роля при инициирането и “разрешението” на някои възпаления, при хроничните възпаления (Mantovani et al., 2011). Дори Thomas C and Schröder K, 2013, смятат, че ПМН чрез системата PRRceptors е ключов регулатор на in vivo имунния отговор при развитие на възпалението и инфекцията.

Оценката на ролята на ПМН в развитието на in vivo отговора на организма изисква мониториране на съществените процеси. Това се прави с моделиране на заболяване в мишки, плъхове, зайци, овце и др. Мониторирането, т.е. изследването на определени компоненти - примерно проследяване на продукцията на цитокини и тъканната или васкуларна локализация, както и клетките източници на тези цитокини, се прави чрез „убиване” и вземане на съответните органи в определени моменти от развитие на патологията и последващо изследване – хистохимичен анализ. Взема се и серум през определени интервали и се изследват с хемилуминесцентна ELISA, количествена PCR или друг чувствителен метод.

Съществува тясна връзка между функционалното състояние на ПМН и момента в развитието на имунния отговор. ФС на ПМН бихме могли да оценим с

хемилюминесцентния метод. Така бихме могли да мониторираме в кръвен поток ФС на популацията на ПМН.

Често при *in vivo* изследванията се използва еднократна или продължителна интравенозна инфузия на LPS или интратрахеално инжектиране на ендотоксини, за да се предизвика остро възпаление (Parsey MV et al, 1998; Williams JH et al, 1993; Imamura S et al, 1997; Cirelli RA et al, 1995).

При опитите със заек Imamura S et al., 1997, е намерил пик на MPO активността на единица маса хомогенат (която отразява натрупалите се ПМН) в бял дроб на първия час, след което ПМН броят (оценен чрез MPO активността) не се променя за следващите 48 часа. Този стационарен пул на ПМН вероятно е в резултат на равенството на потока новопостъпили ПМН и броят „загинали” ПМН за единица време чрез апоптоза или neutrophil extracellular traps (NET’) процеси. Това ни дава основание да мислим, че подобна зависимост вероятно има и в нашия експеримент, при влятата еднократна доза Zymosan.

Времевият ход на концентрацията в серума на изследваните в тази публикация цитокини е: TNF-а се увеличава и стига пик на 1-вия час и бързо стига до нивото преди LPS вливането на 3-ия час. IL-1b не се детектира по време на опита. IL-8 е под детектируемия праг с изключение на 2-ия час. IL-1RA започва увеличение на 1-ия час, достига пик на 3-ия час и се връща на фоновото ниво на 6-ия час. Всички тези цитокини модулират по някаква кинетика функционалното състояние на ПМН и следователно евентуално праймират процеса на генериране на АФК при последващо стимулиране с частиците Zymosan.

Изследваните цитокини, които се изливат в кръвно русло са с малка концентрация, трудно детектируеми, но все пак осъществяват прайминг и променят функционалното състояние, което можем да наблюдаваме.

При нашият експеримент с екстракорпоралното кръвообръщение на заек се наблюдават два пика – първият е остър на 20-та минута от вливането на Zymosan, и втори – силно заоблен пик на около 90-та минута. До 150-та минута ХЛ интензитет пада до около 30% от фоновата ХЛ, преди вливането на Zymosan. Повече от половината време се регистрира много висок ХЛ интензитет.

ХЛ интензитет, който регистрираме с ФЕУ, зависи от потока ПМН, който минава през проточната камера. Регистрираният от нас ХЛ интензитет се формира и от добре познатата ни индивидуална кинетика на развитие на отговора - от 0 до максимална стойност и пада до нула. Принос към наблюдаваната ХЛ имат и евентуално адхезирани в камерата ПМН, които са фиксират за времето на експеримента. Картината е доста сложна за анализ и изисква още много допълнителни експерименти. Все пак основната цел - апробирането на системата и доказването на работоспособността и е постигната.

## **6. Нова методика за изследване на функционалното състояние на левкоцитите в плеврални изливи.**

### **6.1. Проблеми при използването на съществуващите хемилуминесцентни техники**

За един от показателите, характеризиращ функционалното състояние на ПМН в плеврални течности - активността им да генерират активни форми на кислорода, не са намерени публикувани данни. Тази активност би могла да се оцени на базата на параметри на ХЛ кинетика, получена при стимулиране на левкоцитите.

Съществуват проблеми, непозволяващи използването на съществуващите клетъчни хемилуминесцентни техники при изследване на плеврални течности:

- технологиите за изолиране на ПМН не могат да се използват поради малкия брой ПМН при трансудатите и/или много трудно изолиране при много различния състав на плевралните течности и променените плътности на клетките.
- директното използване на пунктатната течност е затруднено поради нейното многообразие и големия диапазон на ПМН (Милчев М, Златанов З, 1982; Light R et al, 1973).

Целта ни е разработването на хемилуминесцентен методика, позволяваща изследването на активността на ПМН в плеврални изливи с различна етиология. Разработката включва уточняването на изискванията при вземането и съхраняването на пунктатната течност, състава на измерваните хемилуминесцентни проби, измерването, обработката и интерпретацията на получените хемилуминесцентни резултати.

### **6.2. Особенности при използване на хемилуминесцентен метод за оценяване активността на ПМН от пациенти с плеврален излив**

Пунктатите се характеризират с голям диапазон на броя ПМН - от 0 до  $10^9$  клетки/ml и са среда със силно вариращ състав и плътност (Милчев М, Златанов З, 1982; Light R et al, 1973). Не могат да се използват технологиите за изолиране на ПМН и ще се използва разрежена пунктатна течност.

Състава на пробата трябва да позволява ХЛ параметри добре да диференцират ПМН в различно ФС (на пунктатните спрямо кръвните ПМН при различните заболявания).

Интензитетът да е достатъчен за достоверно отчитане, впредвид чувствителността на апаратурата.

### **6.3. Хемилуминесцентен метод за оценяване активността на ПМН от пациенти с плеврален излив**

#### **6.3.1. Съхраняване**

Съхраняването на пробите да осигурява минимална промяна на ФС състояние на ПМН от кръвта и пунктата. При опити с различни изливи сме установили, че най-слабо се променя активността им при съхраняване в самия неразреден пунктат, с добавка на хепарин, особено необходим за случаите при хеморагични изливи. При стареене на

пробите за повечето случаи е допустимо ХЛ измерване да се прави до 2.5 ч. от пункцията. В този времеви интервал относителните времеви и интензитетни параметри са сравнително стабилни (Фиг. 24).

### **6.3.2. Влияние на средата по време на записа на клетъчната ХЛ**

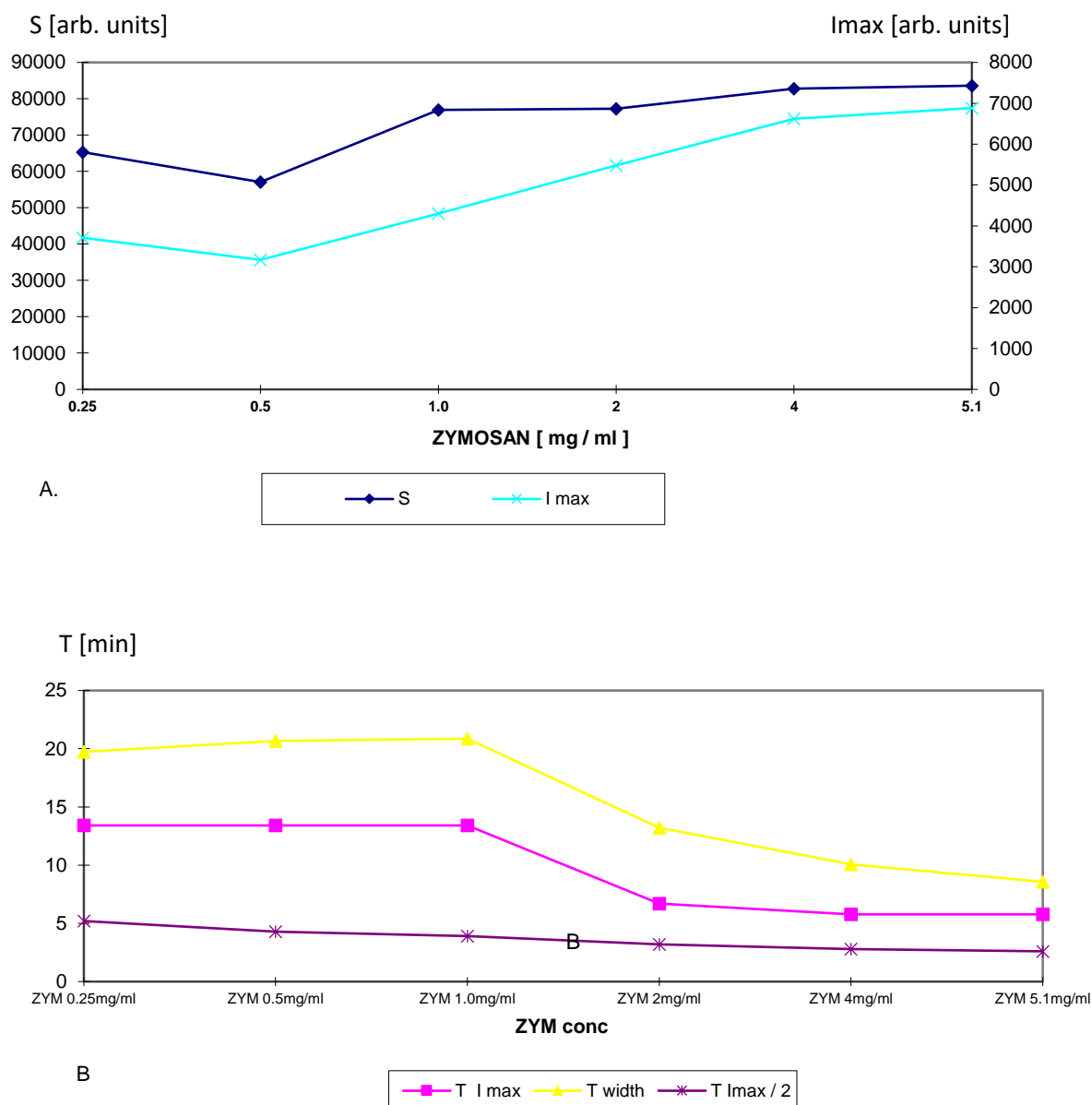
Това сме го тествали, като след центрофугиране на пунктатна проба сме взели супернатанта и сме проверили дали той самостоятелно предизвиква луминесценция. При изследваните от нас пациенти не сме намерили наличие на ХЛ от пунктатните проби с отстранени клетки.

### **6.3.3. Състав на пунктатната измервана проба.**

**(1) Химически активатор:** Използуван е луминол. Количеството му трябва да е достатъчно при плеврални изливи с малки количества ПМН (виж IV 6.6.2). При високи концентрации луминол ( $>10^{-4}$  mol/l) той има стимулиращ ефект върху левкоцитите. Избрана е крайна концентрация Luminol в пробата  $10^{-5}$  mol/l с добра диференцираща способност, установена от нас и от други автори (Zgliczynski JM et al.).

**(2) Стимулант:** Използуван е Zymosan с крайна концентрация 0.3 mg/ml, позволяващо максимална изява на ПМН с различно функционално състояние.

**(3) Разреждане на пунктатната течност:** Работено е с възможно най-високото разреждане на пунктатната течност, за минимално влияние на средата върху ПМН отговора, както и заради пунктатите с голяма мътност. Разреждането трябва да е такова, че да има достатъчен брой ПМН в пробата, за достатъчно силен ХЛ интензитет, осигуряващ достоверност на измерванията. ХЛ интензитет е по-голям от 3 пъти фоновия.



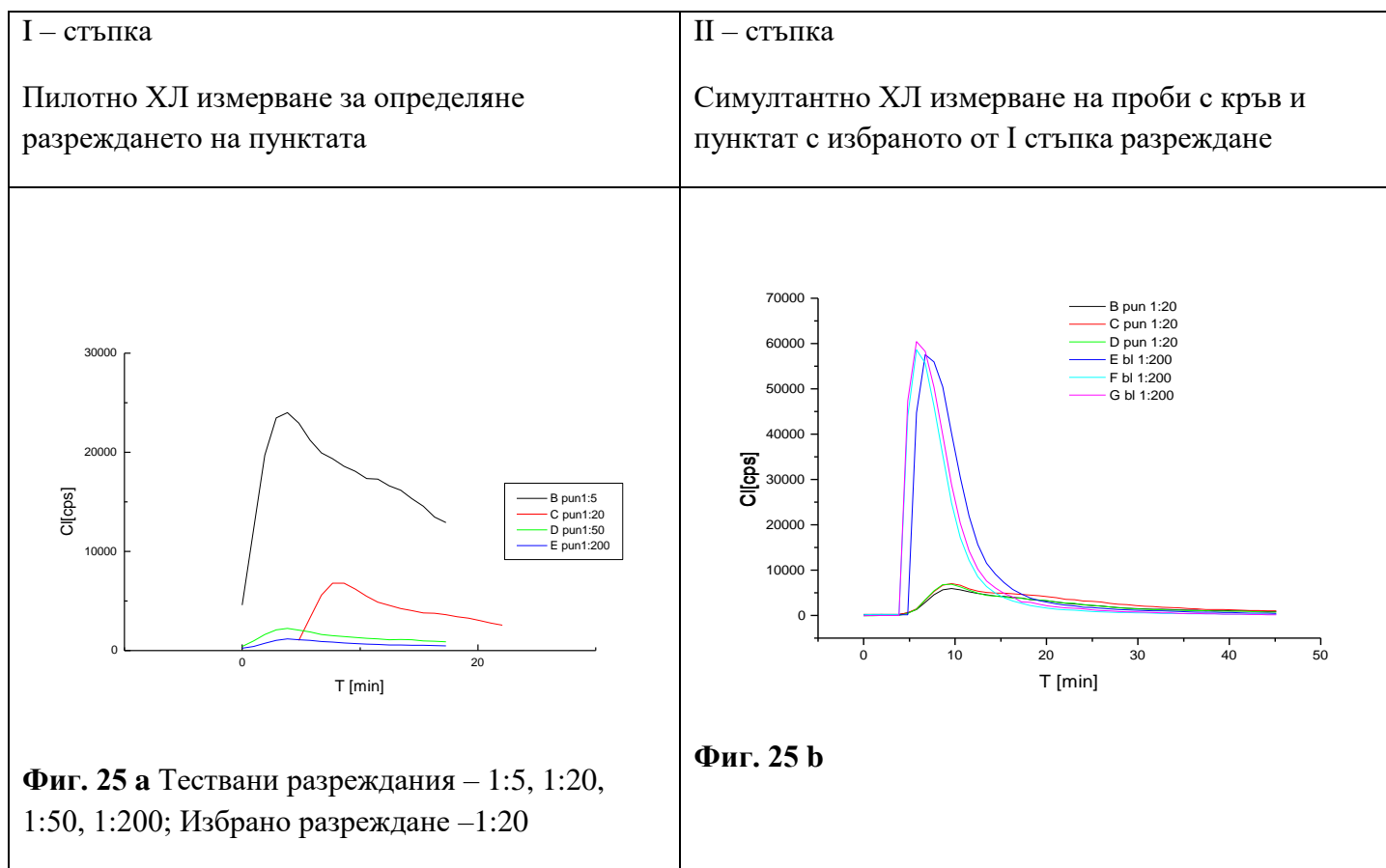
**Фиг. 24** Зависимост на интензитетните (А) и времеви (В) параметри от концентрацията на zymosan в пробата (представителна крива от 4 експеримента).

(4) **В заключение:** Пробата пунктат има обем 2 ml и Luminol с крайна концентрация  $10^{-5}$  mol/l и Zymosan – 0.3 mg/ml, пунктат и KRP буфер, впредвид разреждането.

#### 6.3.4. Измерване на ПМН ХЛ в кръв и пунктат

**I стъпка** - Предвид броя ПМН и RBC в пунктата и чувствителността на ХЛ апаратура, се избира набор разреждания, с които се пуска пилотно измерване за установяване максимално възможното разреждане на пунктата (Фиг. 25 а). RBC силно поглъщат луминоловата хемилуминесценция. Критерии за избор на разреждането са: максимално разреждане и достатъчен сигнал за измерване ХЛ кинетика (IV 6.3.3 – (3)).

**II стъпка** – Симултантно измерване на три проби с кръв и три с пунктат (Фиг. 25в) (с избраното при I стъпка разреждане).



### 6.3.5. Обработка на „суровите“ ХЛ кинетични данни.

(1). Получената всяка ХЛ кинетична крива се коригира за апаратния и кюветен фон. Данните се апроксимират с кубичен сплайн.

(2). Компонентния състав на плевралната течност в повечето случаи е близък до този на кръвта. Впредвид разреждането на кръвта и броят ПМН и RBC, корекция на ХЛ кинетика по отношение на броят ПМН и RBC се прилага, както е описано в предишните раздели на дисертацията и публикувано в **Bechev et al, 1993**.

(3). Анализ на база стандартни параметри на кинетичните ХЛ криви – виж Материали и методи, II 10.2.2.1.

(4) Анализ на база компонентен модел на кинетичните ХЛ криви – виж Материали и методи, II 10.2.2.2.

От намерените параметри на всички пунктатни и кръвни ХЛ компоненти, се формират SEV координатите на различните функционални състояния на ПМН (Magrisso, M et al, 2000). Формират се и допълнителни производни променливи, за целите на описване на двете популации ПМН – в кръвта и в пунктатната течност. Прави се анализ, в зависимост от целите.

### 6.3.6. Защо характеристиката на пациенти с плеврален излив чрез сравнение ФС на пунктатните ПМН с ФС на ПМН от кръвта на пациента е полезна ?

Обикновено активността на ПМН при патология се оценява като се сравнява спрямо средностатистическата норма на здрави индивиди или спрямо минал момент от

развитието на патологичния процес. Има сравнително голяма вариация на ХЛ средностатистическа норма. Освен това ХЛ параметри на индивида варират в зависимост от времето на измерване през деня, седмицата и т.н. (Ristola M and Repo H, 1990). За да се намалят тези проблеми, се сравняват параметри на ХЛ отговор на ПМН в пунктата и тези на ПМН в кръвта от пациента в едно измерване, в един фиксиран момент.

#### **6.4. Апробиране на новата методика за изследване на функционалното състояние на левкоцитите при пациенти с плеврални изливи**

В предишни изследвания ние сме доказали, че при емпиеми и някои парапневмонии в активна фаза ПМН в плевралната течност се различават по своите функционални характеристики от ПМН в кръвта (Bechev et al., 1997). Както отбелязахме в обзора се модулира по специфичен начин регистрираното ФС на ПМН популацията, което се дължи както на променения брой левкоцити в субпопулациите с различно функционално състояние, така и на променените функционални характеристики на отделните субпопулации

На базата на това променено функционално състояние, ще се опитае да диференцираме различните типове плеврални изливи, както и да се потърсим връзка с етиологията.

##### **6.4.1. Функционално състояние на ПМН на изследваните пациенти**

За изследваните 20 пациенти са определени ФС на ПМН (Таблица 3) като са използвани предварително дефинираните ФС чрез CEV координатите на база компонентното моделиране (Таблица 4).

Пациент №	Диагноза	Функционално състояние на кръвни ПМН	Функционално състояние ПМН в плевралния излив
1	Сърдечна застойна недостатъчност	CL EH VL resting	CL EH VH Stand-by
2	Пневмония дясно	CL EH VL resting	CH EH VH effective
3	Белодробен карцином	CL EL VH stand-by	CH EH VH effective
4	Метастази в б. Дроб, първич. Огнище другаде	CL EH VH restOring	CL EH VH restOring
5	Туберкулоза	CH EH VL alternatively activated	CL EH VH restOring
6	Киста черен дроб, нагнояване	CH EH VH effective	CH EH VH effective
7	Пневмония двустранна	CH EH VL alternatively activated	CH EH VH effective

8	Белодробен карцином	CH EH VL alternatively activated	CH EH VL alternatively activated
9	Белодробен карцином	CH EH VH effective	CH EH VH effective
10	Пневмония двустранна	CH EH VL alternatively activated	CH EH VL alternatively activated
11	Миелопластичен синдром-предлевкемия	CH EH VH effective	CH EH VH effective
12	Пневмония	CH EH VH effective	CL EL VH stand-by
13	Асцит	CL EH VH restOring	
14	Карцином	CH EH VH Effective	CH E0 VH fighting-effective
15	Пневмония	CH EH VL alternatively activated	CH EH VH effective
16	Емпием	CH EH VL alternatively activated	CH EH VH effective-fighting
17	Туберкулоза	CH EH VL alternatively activated	CL EH VH restOring
18	Белодробен карцином	CH EH VH effective	CL EH VH restOring
19	Емпием	CH EH VH effective	CH EH VH effective
20	Карцином	CH EH VH effective	CH EH VH effective

**Таблица 3** Диагнози на пациентите и съответните ФС на ПМН популацията в кръвта и пунктатната течност.



При определяне на ФС на ПМН популацията сме използвали състоянията, дадени в Таблица 4.

CEV координати	Функционално състояние на ПМН	Functional states of ПМН
CL EH VL	спокойно	resting
CL EL VH	готовност	stand-by
CH EH VH	ефективно	effective
CH EL VH	бойно	fighting
CH EH VL	алтернативно активирано	alternatively activated
CH EL VL	възпрепятствано активирано	frustratedly activated
CL EH VH	възстановяващо	restoring
CL EL VL	възпрепятствано	frustrated

**Таблица 4** CEV координати на възможните ФС на ПМН съгласно публикуваната статия (Magrisso M et al, 2000).

#### **6.4.2. Информативност на регистрираното ФС на ПМН в плевралния излив и какво трябва да се има в предвид при анализа му?**

**1. ПМН в ПИ произхождат от различни части на кръвобръщението.** Те в крайна сметка преминават от капилярната мрежа, която обвива плевралната кухина с ендотелния васкуларен слой (между него и кухината е и мезотелния слой, който активно участва във всички процеси), или от близко огнище на възпаление, минавайки през интерстициума.

**2. ФС на ПМН преди навлизането в плевралната кухина (ПК) е модулирано от широк кръг заболявания, предизвикващи ПИ.** Карциномът на белия дроб е няколко вида, пневмонията се предизвиква от редица причинители (за които е доказано, че имат различно взаимодействие с ПМН) – бактерии, вируси и туберкулозния бактерий (*Mycobacterium tuberculosis*).

Всичко това води до огромно многообразие в реакцията на имунната система и от там в многообразие на реакциите на ПМН и съответно до различни техни функционални състояния. Според новооформиралото се в последните 10-15 години виждане ПМН играят ключова роля и в поддържане на морфологичната хомеостаза, и в много етапи от развитието на имунологичния и възпалителен отговор, играят значима роля и при кооперацията с останалите клетки на имунитета, както и с клетките на другите тъкани (като ендотела например). И следователно всяко ФС на ПМН ще е показателно за съответното заболяване и етапа в неговото развитие.

В зависимост от етиологичния причинител на ПИ ще има различни ФС на ПМН в ПИ, които евентуално да разграничим.

При трансудативните ПИ, които са с невъзпалителен произход и са причинени от системни променени фактори – повишеното системно венозно и/или белодробно налягане, водещо до повишена филтрация и намалена резорбция от белодробната лимфна система. Тоест няма основание за сериозно придвижване на ПМН към плеврата. При това попадналите там ПМН са основно в резултат на повишено микроваскуларно налягане, т. Е. Механична причина, и няма активация на ПМН от хемотаксични фактори, от активиращи комплемент производни и т. Н., и следователно може да се очаква малка промяна на функционалното състояние на ПМН от спокойно към режим функционална готовност и с малка вероятност да отиде към слабо активирано състояние.

Последното се подкрепя от изследванията на редица изследователски групи, оценяващи възможните отговори и/или променено функционално състояние (оценено с priming ефекта) при ситуации, свързани с ранните и късни фази на адхезията на ПМН към ендотела на кръвоносните съдове и последващо преминаване в интерстициума. Процес, който се случва и при нас – при преминаването на ПМН в плевралната кухина.

Доказано е, че в суспензия на ПМН активацията на NOX от физиологичните стимули C5a, fMLP, TNF $\alpha$  се активира за кратко и се връща в спокойно състояние. Когато ПМН са адхезирани към различни физиологични субстрати, те развиват отговор с генерация на АФК, зависеща от фосфорилирането на тирозините и от  $\beta_2$  интегрините. Последните е доказано, че са свързани и с дегранулацията.  $\beta_2$  интегрините праймират (подготвят и променят) адхезираните чрез тях ПМН за по-силен отговор при последваща стимулация с TNF $\alpha$ . L-selectins са други адхезионни молекули, появяващи се на повърхността на ПМН, които са рецепторни молекули, свързващи се със съответните лиганди от повърхността на ендотела и участващи при адхезията на ПМН към ендотела.

Доказано е, че в суспензия от ПМН, selectin и integrin семействата след cross-linking (свързване на веригите на тези рецептори с молекули, така че се имитира естественото рецептор – лиганд взаимодействие и се индуцира рецепторната активация), води до увеличена генерация на H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Waddell TK et al, 1994). При това активацията само от fMLP, която се знае, че е слаба и преходна, е само 2 пъти по-малка от тази при стимулация с fMLP на cross-linked CD 18 и третирани с миши античовешки CD18 IgG<sub>1</sub>. Освен това стимулацията с PMA, който прескача рецепторните взаимодействия и директно активира РКС и се реализира целият потенциал за генерация на АФК, има в повечето случаи значително по-голяма продукция (до 5 пъти). Доказва се, че ефекта не е праймиране – за увеличената АФК продукция няма значение реда на стимулацията и cross-linking. Подобни резултати се получават със стимулант TNF $\alpha$ , като регистрацията на АФК е с флуцитометричен анализ на dihydrorhodamine белязани ПМН. Освен това от биологична гледна точка е безсмислено самоубийственото изливане на АФК в кръвната циркулация. По-вероятно е изливането на АФК да е ограничено в зоната на адхезията и АФК да играят роля на месенжери, които промотират експресията на P-selectin или ICAM-1, реализирайки положителна обратна връзка (Patel KD et al, 1991; Lo SK et al, 1993).

При луминол активирана хемилуминесцентна оценка на генерираните АФК при различни стимуланти на ПМН, е изследвано потенциалната роля на CD18 (общата  $\beta_2$  субединица на  $\beta_2$  integrin фамилията адхезионни молекули) – тя участва в Lymphocyte function associated molecule (LFA) адхезионна молекула, CR4 (CD11c/CD18), който свързва комплементите iC3b и C3dg, CR3 receptor (CD11b/CD18) – рецептор на ПМН за комплементния компонент iC3b. Установено е, че CD18 cross-linking на ПМН усилва ХЛ

отговор към fMLP, TNF $\alpha$  и GM-CSF съответно 8-, 6-, 1,5 пъти (Liles WC et al, 1995). И това, което е съществено за нас – този „усилен“ отговор е около 20 пъти по слаб от стимулирания с РМА, който реализира целият потенциал за генерация на АФК. Тоест прехода на ПМН от кръвното русло в интерстициума не активира съществено ПМН за генерация на АФК. Не трябва да се забравя, тук се включва и участието на МРО, при дегрануляцията. При нас се използва за стимулант Zymosan, който е предварително опсонизиран и е в концентрации, позволяващ реализирането на значителна част от потенциала.

**2. Важен е моментът в развитието на заболяването,** който определя моментното ФС на ПМН в кръвта и огнището (ако има такова) и оттам в постъпващите в плевралната кухина ПМН. Естествено това дава възможност за мониториране развитието на заболяването.

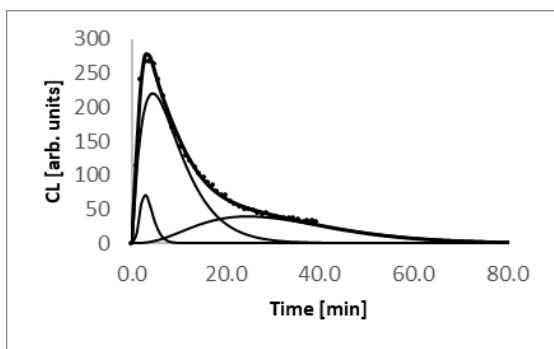
Например парапневмоничните бактериални изливи, които се свързват с острата фаза на пневмонията и водят до възпаление на плеврата. Има времево стадиране на процесите (виж обзора) (Плеврата, под редакцията на К. Костов и Д.Калев, София 2006 г.).

Тъй като изследваме пациенти с ПИ, то очевидно изследваните от нас парапневмонични изливи са преминали 1-ви стадий – „Сух“ плеврит. Ако определяме ФС на ПМН от пациент във 2-и стадий, то в плевралната кухина (ПК) няма микроорганизми. Тогава вероятно процесите в ПК не ще променят съществено ФС. При проба от пациент в 3-и стадий имаме плеврална неутрофилия, активно поглъщане, „убиване“ и „смилане“ на бактериите от ПМН. Левкоцитите секретират големи количества медиатори и при разграждането на бактериите, се отделят големи количества фрагменти от бактериалните мембрани, които допълнително модулират ФС на навлизащите в ПК нови ПМН. Тоест очевидно ще се промени ФС на ПМН. При емпиемите микроорганизмите вече се детектират с бактериални посеви, тоест броят им е голям и нараства. Поради размножаването им и навлизането на микроорганизмите в ПК от периферните области, то започва превалиране на новопоявяващия се поток микроорганизми над потока изчезващи, в резултат на работата на фагоцитите. Средата, която модулира ПМН е различна от тази при предходния стадий, има повече загинали и лизирани ПМН и бактерии, както и промененото рН и биохимичен състав на средата ще доведат до нови, различни промени в ФС на ПМН.

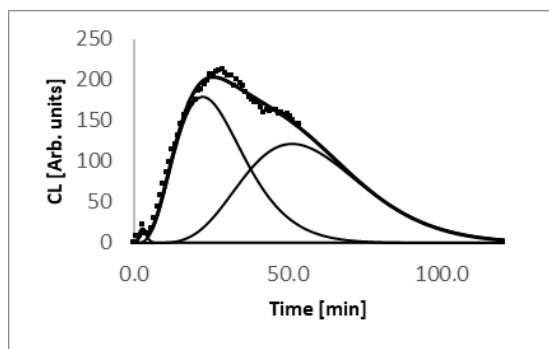
Друга патология, която сме изследвали е карциномната. Имунологичната реакция (включително и ПМН реакцията) също е динамична и това отново ще доведе до различно ФС на ПМН към момента на развитието на патологията.

Следователно можем да считаме, че изучаването и детерминирането на ФС на ПМН е с информативна стойност по отношение момента от развитието на дадена патология.

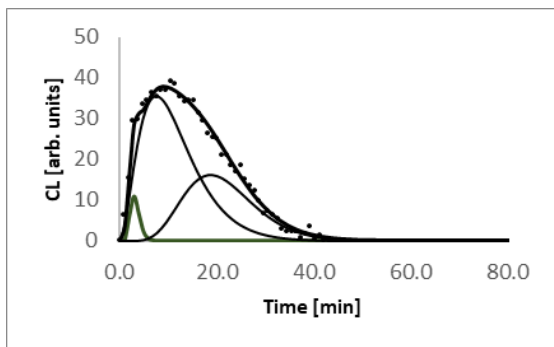
Развитието на процесите в плевралната кухина модулират присъстващите в плевралната течност ПМН. Дискутирахме тези процеси в предходните точки. Действително ние наблюдаваме различни ФС на ПМН при изследваните от нас пациенти (Таблица 5).



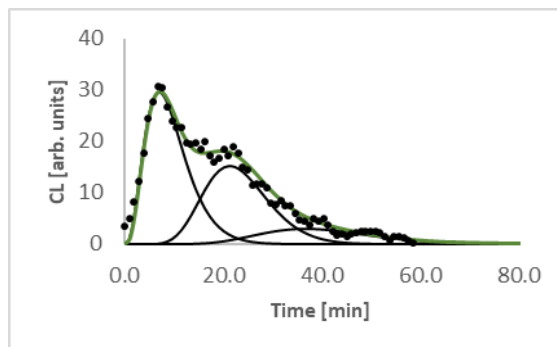
„ефективно“



„алтернативно активно“



„възстановяващо се“



„готовност“

**Таблица 5** В клетките на таблицата са дадени фигурите, визуализиращи наблюдавани функционални състояния на ПМН при изследваните пациенти (Точките са експерименталните данни, обвиващата крива е апроксимиращата моделна крива и трите вътрешни криви отразяват трите моделни компоненти).

### 6.4.3. Прехода на кръвните ПМН в плевралната кухина променя ли тяхното ФС?

Установено е, че често след преминаването на кръвните ПМН в плевралната кухина и престоят им там до момента на вземане на пунктата, се променя тяхното ФС.

При преминаването на ПМН в плевралната кухина те може да променят своето ФС в резултат на преминаването от капилярната мрежа (над плевралната стена) през ендотела на съдовете, после през плевралната стена (през мезотелния слой, който играе активна роля) в плевралната кухина или през интерстициума (съединително-тъканното пространство) и пак през плевралната стена в плевралната кухина. От друга страна вътре в плевралната кухина средата е различна от тази в кръвта, и в която се развиват различни процеси (виж IV 6.4.2 - Информативност на регистрираното ФС на ПМН в плевралния излив).

Формирахме две групи - групата на инфекциозните заболявания, в която сме включили пациенти с пневмония, емпием, туберкулоза и киста на черният дроб и втора група – тази на карциномите.

	Пациенти с променено ФС [брой]	Пациенти с непроменено ФС [брой]
Инфекциозни заболявания	7	3
Карциноми	3	5

**Таблица 6** Промяна ФС на ПМН при преминаването им от кръвната циркулация в плевралната кухина.

При инфекциозните заболявания при 70 % от пациентите прехода променя ФС на ПМН, докато при карциномите е само 37,5 % (Таблица 6). Това е защото при парапневмоничните изливи при 3-ти и 4-ти стадий в ПК има микроорганизми, и процесите вътре в ПК са тези, които модулират ФС. Аналогично е и при туберкулозата. В случая на пациента с киста на черния дроб, се доказва, че последната е гнойна и няма пренос на микроорганизми в ПК, и не се променя ФС на ПМН (Bechev et al, 2017).

При карциномите, ако няма метастатични процеси в плевралната кухина и продукти от обмяната на метастатични клетки, които биха променили ФС, то вероятно няма да се промени ФС. При повечето пациенти има белодробен карцином, при него процеса на метастазирание води до промяна на ендотелната проницаемост и промяна на проницаемостта на мезотела, по един специфичен механизъм, който вероятно не променя ФС на ПМН. Малигнените клетки експресират CD44, който е рецептор за хиалурона, с който се свързва. Последният е протеин на плевралния екстрацелуларен матрикс, произвеждащ се от мезотелните клетки. Комплекса CD44-хиалурон спомага не само за прикрепването към плевралната стена, но и за преминаването и десиминацията на малигнените клетки.

Дали ФС на ПМН ще се промени зависи от вида тумор, неговата фаза в развитието, локалната тъкан, където се е развил. Дали има малигненост в ПК, със съответно променена цитология, или туморът е парамалигнен – тоест в ПК няма малигнени клетки, а локализираният другаде карцином, по най различни механизми, описани в обзора, води до ПИ. Труден е анализа, защо не са се или са се променили ФС, защото факторите са много. Пилотните опити показват, че при повечето пациенти с карциноми (62,5 %), при преминаването на ПМН от кръвния поток в плевралната кухина не си променят ФС.

#### **6.4.4. ФС на ПМН при трансудативни изливи**

Бе установено, че когато ПИ са действително без възпалителен компонент, то състоянието на ПМН от кръв би трябвало да се класифицира като CLENVL (“състояние на покой”) и за ПМН от ПИ със състояние CLELVH (“състояние на готовност за отговор”). Може да се очаква, че при ПИ ПМН са в “състояние на готовност за отговор”, когато те попадат от кръвната популация в плевралната кухина поради физични причини (повишено хидростатично налягане в плевралните капиляри и/или снижено колоидно-осмотично налягане в кръвната плазма), а промяната във ФС основно става под действие на биологично активни молекули по рецепторен механизъм. След преминаване през капилярните стени, те са праймирани (Witko-Sarsat V. Et al, 2000; Bechev et al., 2016; Bechev et al., 2017) и може да променят тяхното състояние в “състояние на готовност за отговор”. Последно споменатият сценарий не е ефективен, малко вероятен (няма биологични причини за него), тъй като липсват причинители (които да активират ПМН), което се доказва по липсата на бактерициден растеж и находка за възпалителен процес в

храчка, в ПИ и никъде другаде. В същото време стойността на параметъра скорост  $V$  е висок, което вероятно е в резултат на преминаването през капилярните стени.

ПИ от пациент с киста в черния дроб бе оценяван според критериите на Light и според експертната оценка на лекарите като трансудативен ПИ. ХЛ компонентен анализ разкри, че ПМН популацията от кръв и от ПИ е в активирано състояние. При този случай има супурация (нагнояване) в черния дроб, т.е. ФС на ПМН в тази ситуация установява наличие на активирани ПМН, дължащо се на гнойната киста, която променя ФС на ПМН в активно. Тоест, макар че ПИ е трансудативен по всички критерии, то ФС установява наличието на източник, предизвикващ активацията им (Bechev et al., 2017).

#### 6.4.5. ФС на ПМН при пациенти с инфекциозни заболявания

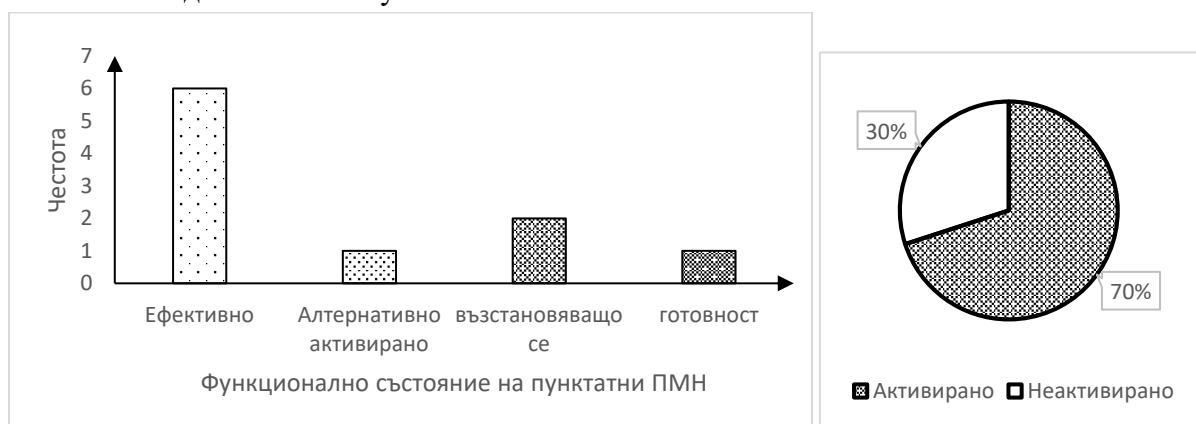
##### 1. Изследване ФС на кръвните ПМН



**Фиг. 26** Функционални състояния на кръвни ПМН от пациенти с инфекциозни заболявания. Дясната кръгова диаграма отразява дялът на пациентите с кръвни ПМН, които са активирани (в състояния ефективно или алтернативно активирано).

ПМН в кръвта (Фиг. 26) са основно в активирани състояния – 9 от 10 случая. Не е изненада големият процент пациенти с ПМН в активирано състояние. Интересното е, че повече от половината - 60 % са в едно от активираните състояния – „алтернативно активирано“ състояние. При него има голям капацитет за генерация на АФК, както и висока ефективност – основно е във фагозомата, но се наблюдава малка скорост – тоест, включени са главно процеси, непряко свързани с фагоцитозата. За ФС „алтернативно активно“ състояние досега не са публикувани преки доказателства за съществуването му.

##### 2. Изследване ФС на пунктатните ПМН.



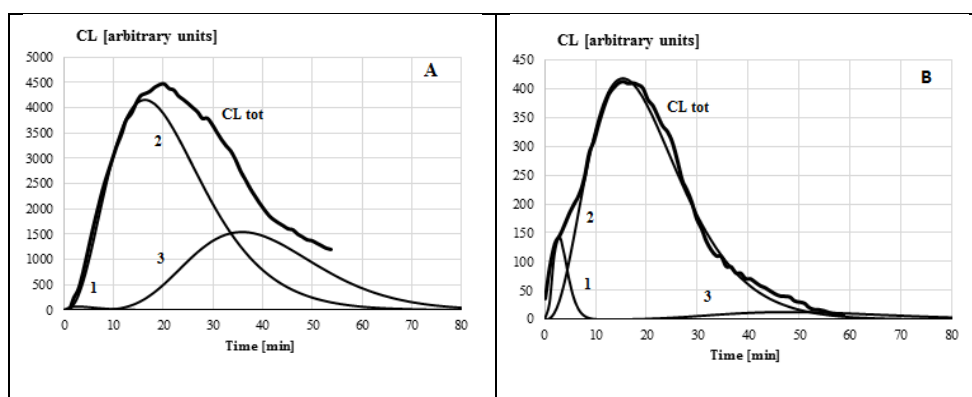
**Фиг. 27** Функционални състояния на пунктатни ПМН от пациенти с инфекционни

заболявания. Дясната кръгова диаграма отразява делът на пациентите с пунктатни ПМН, които са активирани (в състояния ефективно или алтернативно активирано).

ФС на ПМН в плевралния излив (ПИ) при пациентите с инфекциозни заболявания 70 % са в активно състояние, като 60 % от тях са в „ефективно“ състояние. Отново имаме едно преобладаващо активирано състояние, а именно „ефективно“ състояние (Фиг. 27).

#### 6.4.6. Функционално състояние на ПМН при пациенти с карцином.

От изследваните ПИ при пациенти с белодробни карциноми, карциноми локализиращи не в белият дроб и миелопластичен синдром (предлевкемично състояние), изпъкват два случая (Vechev et al, 2017). За първият пациент бе записан екстремно висок ХЛ отговор (Фиг. 28 А). Клиничното състояние съответстваше на остро състояние при развитието на заболяването. Функционалното състояние на ПМН популацията в кръвта и в ПИ бе високо „ефективно“ състояние (СНЕНVН) с максимален капацитет (СН) за производство на АФК над 30 пъти надвишаващ нормалния капацитет, ексцесивна ефективност (ЕН) над 100 пъти надвишаваща нормалната ефективност и така също много голяма скорост (VН). Явно карциномът на този пациент провокира много мощен отговор, което подкрепя твърдението, че един карцином може да индуцира много мощна активация на ПМН. Това привежда факти за главната и по-многогранна и значима роля на ПМН по време на развитие на карциномите (Dallegrì F. et al., 1984, Di Carlo et al., 2003).

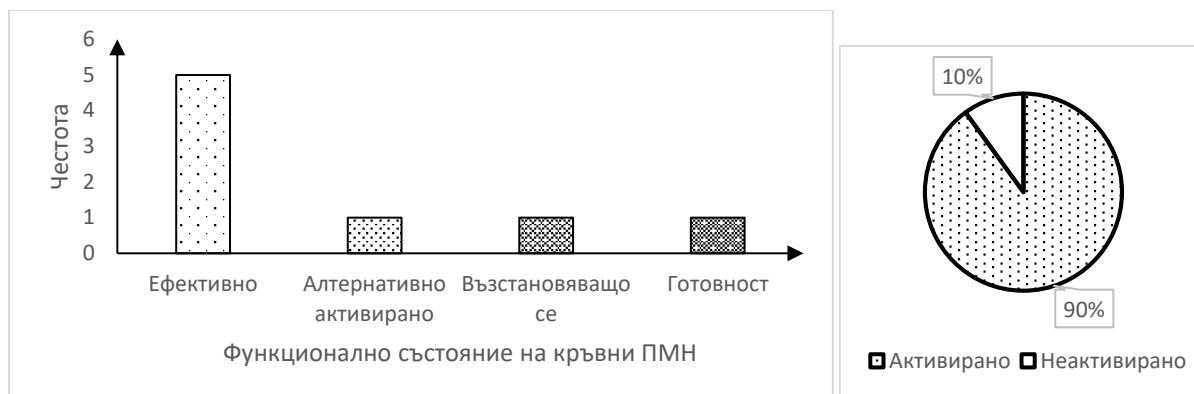


**Фиг. 28** Компонентен анализ при два случая на карцином в остро (А) и в хронично (В) състояние при развитие на заболяването. При острото състояние ФС на ПМН в кръв и пунктат бе „ефективно“ състояние (СНЕНVН), с максимален капацитет (СН) над 30 пъти надвишаващ нормалния капацитет, ексцесивна ефективност (ЕН) над 100 пъти надвишаваща нормалната ефективност и голяма скорост (VН). При хроничното състояние (В) - ПМН популацията от кръв бе (СЛЕLVН), съответстваща на състояние „изтощено“ или „готовност“, а тази на пунктат – „ефективно“. Записаният тотален отговор е обозначен като ‘ХЛ tot’ и кривите 1, 2 и 3 представят съответно компонентите I, II и III.

Вторият пациент бе в хроничен стадий на развитие на заболяването (Фиг. 28 В). Тук ПМН популацията от кръв бе (СЛЕLVН), което вероятно кореспондираше с „изтощено състояние“, т. е. неспособността на ПМН да демонстрират едно активирано състояние по време на стимулация със zymosan. Тъй като е неразлично това състояние от ФС „готовност“, то това е също възможно състояние. По време на опита не се знае предварително кое е състоянието, то се определя после след анализ на цялата група. Ако е имало съмнение за това състояние, то е можело да се отдиференцират тези две състояния с един допълнителен опит. ПМН популацията от ПИ индикираше ефективно

състояние (СНЕНVН) вероятно поради секретирани молекули от близко локализирания белодробен карцином или факта, че плеврата е в някаква степен възпалена, като степента на възпаление и процесите са времево зависими (Плеврата, под редакцията на Костов К, Калев Д, София 2006 г.).

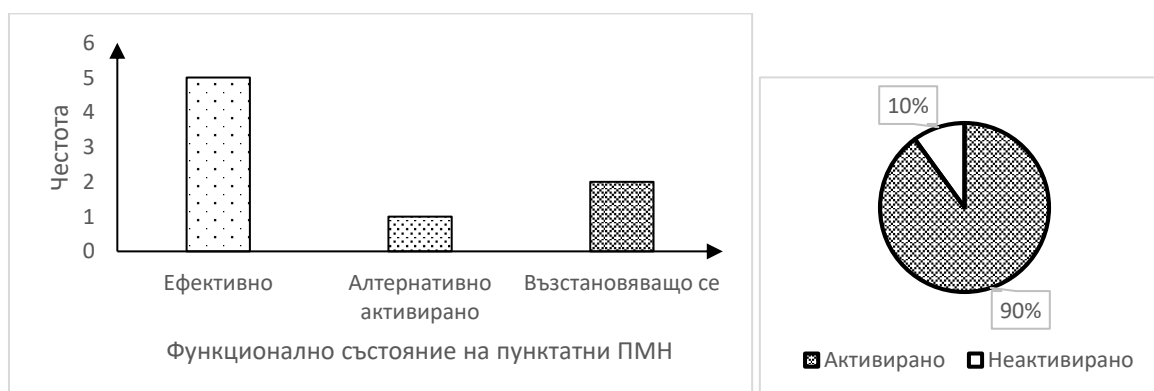
### 1. Изследване ФС на кръвните ПМН



**Фиг. 29** Функционални състояния на кръвни ПМН от пациенти с карцином. Дясната кръгова диаграма отразява делът на пациентите с кръвни ПМН, които са активирани (в състояния ефективно или алтернативно активирано).

Отново 75 % са в активирано състояние, ефективно и алтернативно активирано (Фиг. 29). Интересно е появата на „възстановяващо“ се ФС. При нас смисълът не е този от статията, описан от (Zgliczynski JM et al.,1988), като състояние на ПМН популация, която се възстановява. По скоро е висока готовност за фагоцитоза (тоест високи Е и V), но с изчерпан капацитет, поради непрекъснатата поява на нови микроорганизми, и/или намаляване притока на свежи левкоцити.

### 2. Изследване ФС на пунктатните ПМН

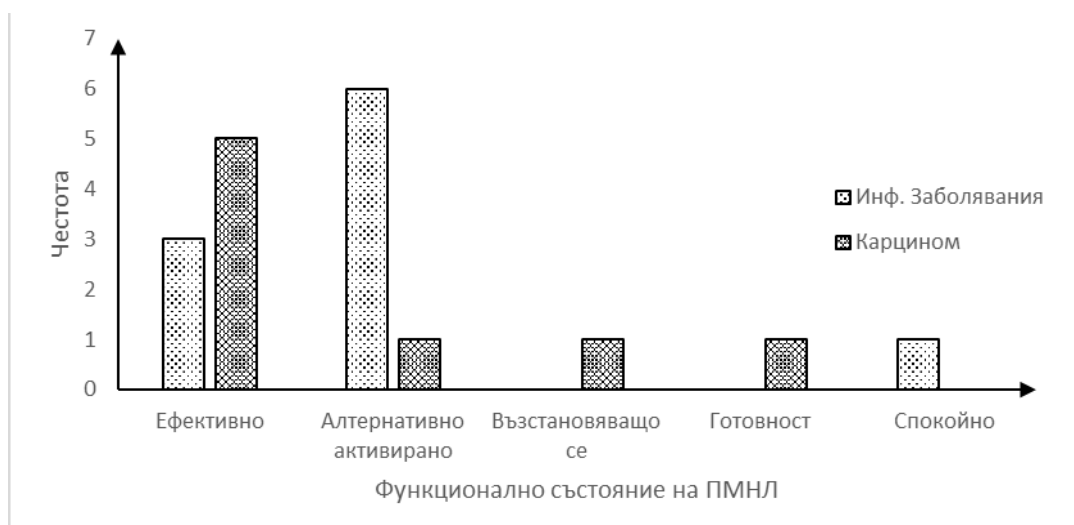


**Фиг. 30** Функционални състояния на пунктатни ПМН от пациенти с карцином. Дясната кръгова диаграма отразява делът на пациентите с пунктатни ПМН, които са активирани (в състояния ефективно или алтернативно активирано).

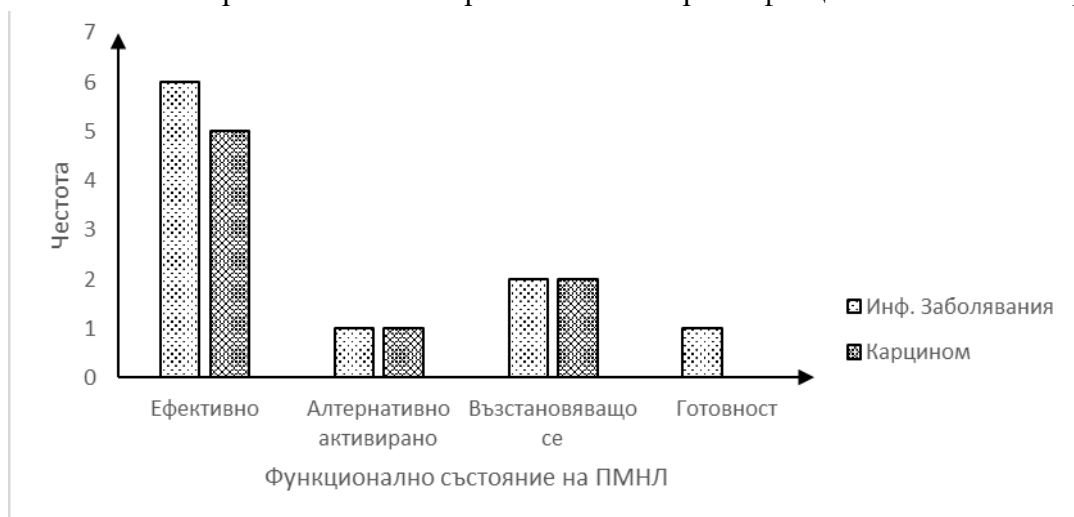
Картината е аналогична на тази в кръвта - преобладаващи са двете активирани състояния – ефективно (при 5 пациента) или алтернативно активирано (при 1 пациент) (Фиг. 30).



### 6.4.7. Сравнение на разпределенията по ФС на ПМН при пациенти с инфекциозни заболявания и с карцином



**Фиг. 31** Сравнение ФС на кръвните ПМН при инфекц. заболявания и карцином



**Фиг. 32** Сравнение ФС на пунктатните ПМН при инфекц. заболявания и карцином  
Вероятно в кръвта на пациенти с инфекциозни заболявания преобладават ПМН в „алтернативно активирано“ (60 %), а тези с карцином - „ефективно“ състояние (62 %) (Фиг. 31).

При пунктатите - преобладават пациентите с ПМН в ефективно състояние, както при инфекциозно болните, така и тези с карцином (Фиг. 32).

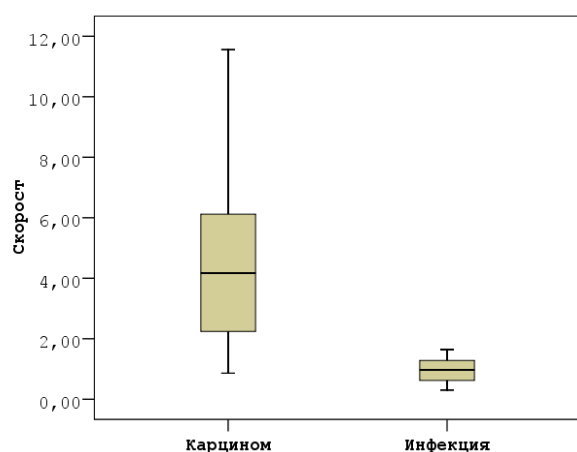
При всички пациенти, в кръвта над 75 % ПМН са в активирано състояние (при инфекциозните – 90 %, а при карциномите – 75 %).

И за двете групи пунктатните ПМН са над 70 % активирани (алтернативно активирано или ефективно), с превес на ефективното – 60 %.

#### 6.4.8. Сравнение на параметрите на ФС - С, Е, V, S1, S2 и S3 при пациенти с карцином и с инфекция.

Тествано е дали разпределението на някои от параметрите С, Е и V, както и S1, S2 и S3 (площите на 1, 2 и 3 компоненти), има различаващо се разпределение при двете групи пациенти с карцином и с инфекция, и като такива да ги диференцират.

С използване на Mann-Whitney Test, единствено параметъра скорост (V) на ФС при кръвните проби даде достоверна разлика ( $p = 0,004$ ). На Фиг. 33 са показани двете кватилни диаграми на параметъра V (скорост) за кръвните ПМН при пациенти с карцином и инфекциозни заболявания. Аналогичен резултат се получава и след логаритмична трансформация на V, целяща да изравни дисперсиите в двете групи, и ANOVA анализ (разликата между групите е с наблюдавано ниво на значимост  $p = 0.001$ ). Нормалното разпределение на V е доказано с теста на Shapiro-Wilk ( $p = 0.4$  за карциномната група и  $p = 0.777$  за инфекциозната група).



**Фиг. 33** Кватилни диаграми на параметъра V (скорост) за кръвните ПМН при пациенти с карцином и инфекциозни заболявания, даващи визуална представа за диференцирането на тези заболявания по този параметър. Двете разпределения са различаващи се и има достоверна разлика между средните (Mann-Whitney Test,  $p=0.004$ ). Аналогичен резултат се получава и при ANOVA анализа - разликата между групите е с наблюдавано ниво на значимост  $p = 0.001$ .

Има голямата дисперсия на изследваните от нас параметри. Едно възможно обяснение е появата на така наречените MDSC (Myeloid-derived suppressor cells) клетки при развитието на карциномните заболявания (Pak AS et al. 1995). С напредването на заболяването, в кръвният поток навлизат незрели миелоидни клетки. Това са моноцит-подобни Мо-MDSC и гранулоцит-подобни G-MDSC субпопулации (морфологично и фенотипно приличащи на моноцитите и гранулоцитите), но с променени активности, като нарушена миграционна способност, увеличена генерация на АФК и секреция на цитокини и хемокини (Brandau S et al, 2011; Feng PH et al., Neuviers ME et al, 2013; Liu CY et al, 2010).

Смята се, че Мо-MDSC и G-MDSC супресират имунният отговор, като механизмите на въздействие са различни при Мо-MDSC и G-MDSC. Гранулоцитните MDSC чрез секретираният от тях АФК супресират пролиферацията на Т-клетките.

G-MDSC имат увеличена секреция на АФК, чрез активирането на NADPH oxidase (Lambeth JD, 2004; Lu T & DI Gabrilovich, 2012). Това ще промени ХЛ отговор. Хроничното възпаление, съпровождащо развитието на тумора, предизвиква акумулация на MDSC, и техният брой ще варира по време на развитието на тумора. Изследваните пациенти са в различни моменти от развитието на карциномите, което ще води до вариация в регистрираният от нас отговор. Следователно, това е едно възможно обяснение на по-голямата вариация на параметрите на ФС на ПМН при пациентите с карцином.

#### 6.4.9. Диференциране на трансудативни от ексудативни изливи

Диференцирането на трансудати от ексудати е ключов момент в диагностичните алгоритми на пациенти с ПИ. Продължава търсенето на надеждни, с висока чувствителност и особено по-добра специфичност методи за дискриминирането им.

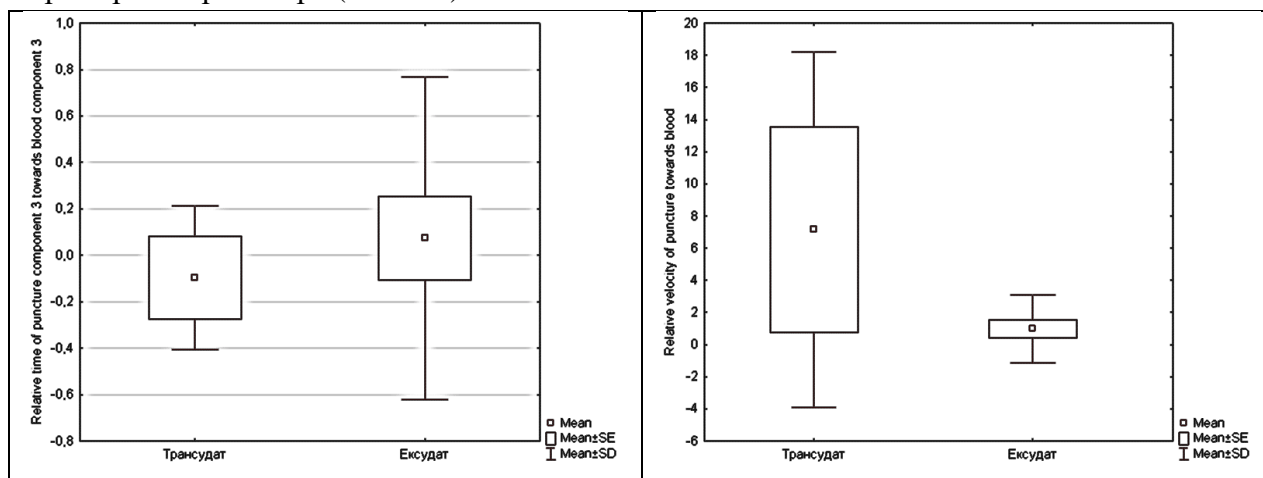
Използваме нашия ХЛ метод за изследване на ПМН в пунктатната течност. На база изследванията на група пациенти с различни диагнози се показва, че може да се получат оценки за функционалното състояние на ПМН, на чиято база може да се разграничат трансудат-ексудат. Дори с очаквана сравнима чувствителност и особено по-добра специфичност спрямо критериите на Light (с не добра специфичност).

При анализа на база параметри на кинетичните ХЛ криви сме въвели хемилуминесцентен индекс – отношение на максималният интензитет на 1 ПМН в пунктата към максималният интензитет на 1 ПМН в кръвта ( $I_{\max \text{ pun}} / I_{\max \text{ bl}}$ ) за отдиференциране трансудати от ексудати. При избраната cut-off стойност на индекса чувствителността и специфичността бяха съответно 87.5 % и 100 %.

При анализа на база компонентен модел на кинетичните ХЛ криви се получават още по-добри резултати, на практика използвания критерий за разделяне напълно разделя двата вида изливи.

Формираме за всеки един пациент набор от 32 параметъра. В него включваме параметри, характеризиращи функционалното състояние на ПМН: параметрите на трите компоненти – амплитудите им, времената на пиковете, капацитета им, обобщените параметри - капацитет, ефективност и скорост (CEV координатите), както и променливи, производни от параметрите на функционалните състояния на ПМН популациите в пунктата спрямо тези в кръвта -  $Si_{\text{Blood}}/Si_{\text{Punktat}}$  ( $Si$ -капацитета на  $i$ -тата компонента,  $i=1-3$ );  $Pi_{\text{Blood}}/Pi_{\text{Punktat}}$  ( $Pi$ -времето на пика на  $i$ -тата компонента,  $i=1-3$ );  $RelEff\_Pun = (\text{Ефективност на Пункт. ПМН} - \text{Ефективност на кръвните ПМН}) / \text{Ефективност на кръвните ПМН}$ ;  $RelVel\_Pun = (\text{Скорост на Пункт. ПМН} - \text{Скорост на кръвните ПМН}) / \text{Скорост на кръвните ПМН}$ ; и др. Повечето параметри имат биологичен смисъл, коментиран в обзора.

Нито един от параметрите не диференцира тотално двете групи – дадени са 2 примерни параметъра (Фиг. 34).



**Фиг. 34** Квартилни диаграми на указаните на графиката параметри, даваща визуална представа за диференцирането на трансудати от ексудати. Relative time of puncture component 3 toward blood component 3 = (Времето на пика на 3 компонета на

пунктата – Времето на пика на 3 компонента на кръвта) / Времето на пика на 3 компонента на кръвта.

Ето защо прилагаме линеен дискриминантен анализ на Fisher за намиране на дискриминантна функция и съответно изчислен индекс (scores), който е съществено различен за изследваните две групи (трансудати и ексудати). Дискриминантният индекс (Trans-Ex) е резултат от линейна комбинация на девет от изследваните 32 параметъра (Таблица 7).

Discriminant Function Analysis Summary						
N of vars in model: 9; Grouping: Transudat_Exudat (2 grps)						
Wilks' Lambda: 0,08954 approx. F (9,8)=9,0383 p< 0,0025						
	Wilks' (Lambda)	Partial (Lambda)	F-remove ((1,8))	p-value	Toler.	1-Toler. ((R-Sqr.))
RelTimeP1Pun	0.385753	0.232119	26.46508	0.00088	0.041676	0.958324
RelTimeP3Pun	0.678197	0.132027	52.59351	8.79E-05	0.015334	0.984666
S1_BI	0.505572	0.177107	37.17036	0.000291	0.032476	0.967524
Vel_BI_to_Vel_Pun	0.226848	0.394715	12.26778	0.008049	0.253514	0.746486
TimeP1BI	0.347565	0.257622	23.05322	0.001353	0.081571	0.918429
RelEff_Pun	0.304675	0.293888	19.22122	0.002336	0.083384	0.916616
RelVel_Pun	0.156687	0.571461	5.999207	0.039979	0.107347	0.892653
S1_BI_to_S1_Pun	0.127545	0.702034	3.395464	0.102623	0.382858	0.617143
Vel_Pun	0.111889	0.800263	1.996719	0.195345	0.426956	0.573045

**Таблица 7** Резултати от прилагането на линейният дискриминантен анализ на Fisher за разделянето на двете групи пациенти.

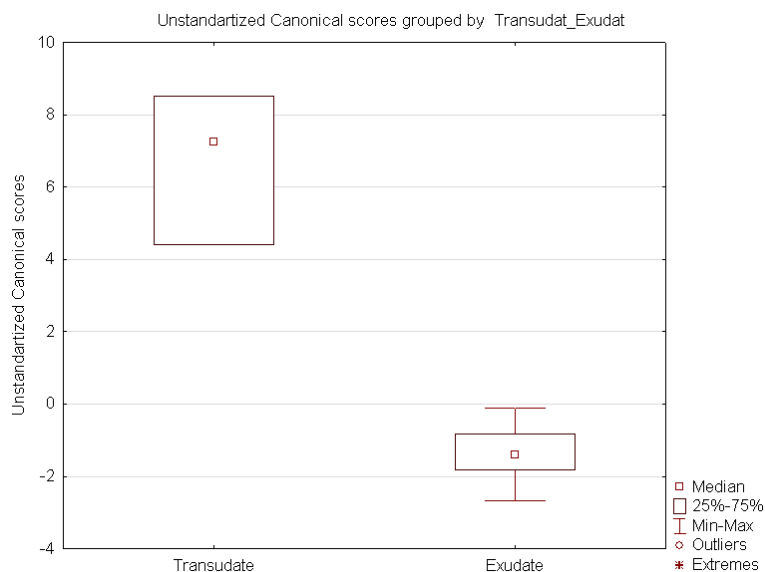
На базата на стандартизираните коефициенти пред избраните диференциращи променливи, най-голям дял при диференцирането имат относителните променливи, което потвърждава предположението ни, че е съществено съотношението между двете функционални състояния на пунктатните и кръвни ПМН (таблица 8).

Значим е делът на дискриминиране на S1Blood, която се свързва основно с генерираните екстрацелуларни активни форми на кислорода и фагоцитозата на ПМН.

Standardized Coefficients	Root 1		Standardized Coefficients	Root 1
RelTimeP1Pun	4.498563		RelEff_Pun	3.049758
RelTimeP3Pun	-7.88491		RelVel_Pun	-2.09397
S1_BI	5.275483		S1_BI_to_S1_Pun	0.924559
Vel_BI_to_Vel_Pun	-1.61938		Vel_Pun	-0.71682
TimeP1BI	-3.16166		Eigenval	10.16813
			Cum.Prop	1

**Таблица 8** Стандартизирани коефициенти (Standardized Coefficients), отразяващи приноса на производните параметри на ХЛ ПМН отговор в разделянето на пациентите с трансудативни от тези с ексудативни изливи.

Така намерената дискриминантна функция напълно разделя двете групи пациенти (виж Фиг. 35).



**Фиг. 35** Разделянето на двете групи пациенти с тансудативни и ексудативни изливи чрез Unstandartized canonical score.

Намерената чувствителност и специфичност е 100 %, при така дефинираната дискриминационна функция. Разбира се това е при същата група пациенти, която сме използвали за определяне на дискриминационната

функция. Необходимо е да се провери класифициращата способност при нови случаи, евентуално да се уточни дискриминиращата функция и настрои a priori probabilities (в нашият случай сме използвали a priori probabilities да е равна на пропорцията на трансудати към ексудати).

Таблица 9 сумира резултатите от нашите изследвания. В нея приемаме за златен стандарт експертната оценка, получена в резултат и на други клинични изяви и параклинични изследвания. Най-вероятно ще се получава чувствителност и по-добра специфичност с използването на хемилуминесцентния метод. Лъжливо положителните ексудати са по-малко с новият тест, в сравнение с критериите на Light et al., което повишава специфичността на метода (Таблица 10).

Метод	Чувствителност %	Специфичност %
Light et al.	100	67
Параметри на ХЛ криви	87,5	100
Компонентен модел	100	100

**Таблица 9** Чувствителност и специфичност на методите, разделящи трансудати от ексудати според анализа на параметрите на кинетичните ХЛ криви, анализа на база компонентен модел и критериите на Light et al.

При използването от нас ХЛ методи се очаква сравнима чувствителност и по-добра специфичност спрямо критериите на Light. Хемилуминесцентното оценяване ще потвърди с по-голяма достоверност диференцирането на трансудати от ексудати при изливи с различна етиология.

## V. ИЗВОДИ

В работата бе изследван един от главните компоненти на имунната система – популацията на полиморфонуклеарните левкоцити. Анализирани са функционалното състояние на фагоцитиращите клетки в различни биологични течности – кръв и пунктат, като са развити и усъвършенствани различни хемилуминесцентни методики.

Създадени са апаратни, хардуерни и софтуерни средства, необходими за интегрални и спектрални хемилуминесцентни изследвания, включително за *in vivo* / *in vitro* мониторинг на хемилуминесценция в кръвен поток и са апробирани. Разработените компютърни луминометри се характеризират с висока чувствителност и с възможност за спектрални измервания на свръхслаба хемилуминесценция.

Усъвършенствана е методиката за изследване на функционалното състояние на левкоцитите в цяла кръв чрез луминол активирана хемилуминесценция, като е разширен диапазона за нормиране спрямо броя полиморфонуклеарни левкоцити и еритроцити. Това разширява диапазона на изследваните пациенти с *neutropenia*, при трансудати, при изследване на проби със силно намален брой полиморфонуклеарни левкоцити и при силно вариращ брой еритроцити.

Спектралните ХЛ изследвания на функционалното състояние на изолирани полиморфонуклеарни левкоцити и левкоцити в цяла кръв са в съгласие с резултатите от други автори, потвърждавайки правилността на методиката за кинетични спектрални изследвания, както и за добрите характеристики на създаденият прибор за кинетични спектрални хемилуминесцентни измервания.

Апробирането на разработените системи за *in vivo* / *in vitro* мониторинг хемилуминесценция в кръвен поток загатват за възможните приложения, като например изследване на остри възпалителни състояния, сепсис, въздействие на магнитно поле върху кръвен поток, и др.

За първи път е създадена методика за изследване на функционалното състояние на полиморфонуклеарните левкоцити в плеврални изливи, чрез анализ на *Zymosan* стимулирани левкоцити и анализ на получените хемилуминесцентни кинетични отговори и е апробирана за клинично приложение.

Относно разделянето на трансудати от ексудати, за в бъдеще е необходимо да се провери класифициращата способност на намерената дискриминираща функция при нови случаи, евентуално да се уточни дискриминиращата функция и настрои *a priori probabilities* (в нашият случай сме използвали *a priori probabilities* да е равна на пропорцията на трансудати към ексудати).

Изключително високата чувствителност на използваните хемилуминесцентни методи, ниска цена за тест и относително проста и немного скъпа екипировка ще спомогне за бърза диагноза, по-адекватно лечение, за оценка активността на някои патологични процеси, свързани с клиничното състояние на пациентите.

## VI. ПРИНОСИ

### 1. Научни приноси с оригинален характер.

- За първи път е изследвано функционалното състояние на ПМН в плеврални изливи.
- При пациенти с плеврален излив с различна етиология (пневмония, включително емпием, туберкулоза, белодробен карцином, киста на черният дроб, хронична застойна сърдечна недостатъчност) е установено наличието на 5 от 8-те функционални състояния на ПМН, дефинирани чрез CEV координатите. (Capacity Effectiveness Velocity).
- За първи път е докладвано наличието на предсказаното „алтернативно активирано“ функционално състояние в ПМН популации.
- За първи път са установени промени в активността на левкоцитите при въздействие с използваното от нас амплитудно модулирано променливо магнитно поле.
- За целите на диагностиката може да се използва:
  - Различната средна стойност на параметъра velocity V (от Capacity Effectiveness Velocity координатите на функционалното състояние на левкоцитите) при двете групи пациенти с карцином и с инфекциозни заболявания.
  - Предложена е методика, позволяваща диференциране на трансудативни от ексудативни плеврални изливи с различна етиология. Тя притежава по-голяма специфичност и сравнима чувствителност спрямо използваните критерии на Light et al.

### 2. Научни приноси с потвърдителен характер.

- Нативните ХЛ спектри на активирани с Zymosan левкоцити, напълно съответстват на спектрите получени от други автори. Това е още едно потвърждение за правилността на методиката за кинетични спектрални изследвания, както и за добрите характеристики на създаденият прибор за кинетични спектрални хемилуминесцентни измервания.

### 3. Приноси с научно-приложен характер

- За първи път е създадена методика за изследване на функционалното състояние на ПМН в плеврални изливи, чрез стимулация на левкоцитите със Zymosan, запис на хемилуминесцентната емисия и анализ на получените кинетични криви.
- Усъвършенствана е методиката за изследване на функционалното състояние на левкоцитите в цяла кръв чрез сенсibiliзирана хемилуминесценция, като е разширен диапазона за нормиране спрямо броят ПМН и RBC, както за пика, така и за интервал около него. Това разширява диапазона на изследваните пациенти с neutropenia, при трансудати, при изследване на проби със силно намален брой ПМН и при силно вариращ брой RBC.
- Създадена е система за in vivo и in vitro мониторинг на хемилуминесценцията в кръвен поток и е апробирана при изследване на активността на левкоцити при въздействие с амплитудно модулирано променливо магнитно поле.
- На базата на традициите, опита и екипната работа на съставът на катедрата по медицинска физика в Медицински Университет Плевен, на базата на анализа на предлаганите търговски луминометри, в предвид желанието ни за изследване на клетъчна хемилуминесценция, както и наши идеи, нереализирани в търговските прибори е направен:
  - Идеен проект с необходимите възможности и параметри
  - Реализация на механичния, апаратен и хардуерни (компютърни) модули.
  - Написан е и софтуера, необходим за тази цел – избор и настройка на режима на измерване, управление на системата за сканиране, възприемане и запис на данните, мониториране в реално време на измерваният ХЛ интензитет от пробите, специализиран софтуер за първична и вторична обработка на "суровите" ХЛ данни.
- Резултатът - разработената компютърна апаратура се характеризира с възможност за спектрални измервания на свръхслаба хемилуминесценция (която възможност търговските луинометри нямаха) и по-висока чувствителност, от разпространените в момента на създаването ѝ търговски апарати.



## **VII. СПИСЪК НА КЛЮЧОВИТЕ ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИЯТА**

1. **Bechev B**, Magrisso M, Bochev P, Markova V, Alexandrova M. Dependence of whole blood luminol CL on PMN and RBC count. *J. Biochemical and Biophysical methods*. 1993; 27: 301-309. **IF-1,338**
2. Bochev P, **Bechev B**, Magrisso M. Six-sample multiplexing computerized analyzer for integral and spectral luminescence measurements. *Anal. Chim. Acta*. 1992; 256: 29-32. **IF-3,186**
3. Bochev P, **Bechev B**, Magrisso M. Influence of magnetic field on phagocyte activation. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*. 1992; 27: 45-48. **IF-2,992**  
(списанието е преименувано - *Journal of Electroanalytical Chemistry*, Volume 342, Issue 1, February 1992 , Pages 45-48)
4. **Bechev B**, Glogovska P. Estimation of pleural effusion type by leukocyte functional state. *Trakia Journal of Sciences*. 2012, 1: 146-149.
5. **Bechev B.**, Stoeff S, Magrisso M, Lazarov V, Trifonova N, Dimitrova D. Chemiluminescent data on the functional state of polymorphonuclear leukocytes (PMNs) from blood and pleural effusions, in cases of inflammation and malignancies. *Series on Biomechanics*. 2016; 30, 1: 43-47. **SJR-0,113**
6. **Bechev B**, Magrisso M, Stoeff S, Glogovska P. Possible application in pulmonology of neutrophil population functional state evaluated by chemiluminescent method. *Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences*, Под печат, **IF-0,251**

## **VIII. СПРАВКА ЗА ОТКРИТИ ЦИТАТИ НА ПУБЛИКАЦИИТЕ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИЯТА**

1. **Bechev B**, Magrisso M, Bochev P, Markova V, Alexandrova M. Dependence of whole blood luminol chemiluminescence on PMN and RBC count. *J Biochemical and Biophysical methods*. 1993;27:301-309. (IF-1,338)
  - 1с. Voeikov Vladimir L, Novikov Cyril N, Vilenskaya Natalia D. Low-level chemiluminescent analysis of nondiluted human blood reveals its dynamic system properties. *Journal of Biomedical Optics*. 1 January 1999; 4(1). <https://doi.org/10.1117/1.429921>
  - 2с. Hać S et al. Neutrophil engagement and septic challenge in acute experimental pancreatitis in rats. *World J Gastroenterol*. 2005 Nov 7; 11(41): 6459–6465. Published online 2005 Nov 7. doi: 10.3748/wjg.v11.i41.6459
  - 3с. Hać Stanisław, Dobosz Marek, Kaczor Jacek, Rzepko Robert. Influence of molecule CD 11b blockade on the course of acute ceruleine pancreatitis in rats. *Experimental and Molecular Pathology*. August 2004; 77, 1:57-65.
  - 4с. Voeikov Vladimir L, Novikov Cyril N. Relative independence of luminol-enhanced intensity of photon emission during oxidative burst from nondiluted human blood on the volume and surface area of the sample. *Proc. SPIE 2982, Optical Diagnostics of Biological*

Fluids and Advanced Techniques in Analytical Cytology, (2 May 1997); doi: 10.1117/12.273657; <https://doi.org/10.1117/12.273657>

5c. Hac S, Dobosz M, Kaczor JJ, Dobrowolski S, Krajewski J, Rzepko R, Gruca Z, Śledziński Z. Does the septic shock interfere experimental acute pancreatitis in rats? *Medicinal Chemistry*.2006; 2 (4):423-429. DOI: 10.2174/157340606777724031

6c. Drăgoiu MS, Giurginca M. Dependența parametrilor cinetici ai chemiluminescenței de factori biochimici și hematologici. determinați din sângele persoanelor expuse câmpurilor electromagnetice. *Revista de Chimie* 2005;56 (10):1036-1039.

7c. Voeikov VL, Novikov CN, Siuch NI. Alterations in luminol-enhanced chemiluminescence from nondiluted whole blood in the course of low-level laser therapy of angina pectoris patients *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering*. 1997; 2985: 286-294.

8c. Brovkovich VM, Moibenko AA, Butovich IA, Brovkovich SD, Ogyl SA. Effect of linoleic acid lipoxigenase derivatives on functional activity of neutrophils. *Ukrain'skyi Biokhimichnyi Zhurnal*. 1996; 68 (3): x12-84.

9c. Farinelli A, Setti M, Puppo F, Scudeletti M, De Martini D, Balestra V, Indiveri F. Quantitative analyses of plasma opsonizing activity and polymorphonuclear cell response during phagocytosis: Standardisation of a chemiluminescent method. *APMIS*.1996; 104 (7-8): 500-508.

10c. Filatov MV, Varfolomeeva EY, Ivanov EI. Flow cytofluorometric detection of inflammatory processes by measuring respiratory burst reaction of peripheral blood neutrophils. *Biochemical and Molecular Medicine*.1995; 55 (2): 116-121. DOI: 10.1006/bmme.1995.1041

11c. Immune defence mechanisms of barramundi (*Lates calcarifer*) peripheral blood against Streptococci, Kelly-Anne Masterman, BSc. (hons), A thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy at The University of Queensland in 2016, The School of Biological Science.

12c. Винник ЮС, Савченко АА, Перьянова ОВ, Теплякова ОВ, Якимов СВ, Теплякова ЕЮ, Мешкова ОС. Клинические аспекты применения хемилюминесцентного анализа. 2006; 5 том 46.

13c. Новиков КН. Роль активных форм кислорода в биологических системах при воздействии факторов окружающей среды. Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук. Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, 2004.

14c. Novikov CN, Voeikov VL, Asfaramov RR, Vilenskaya ND. Comparative study of peculiarities of chemiluminescence in non-diluted human blood and isolated neutrophils. In: *Chemiluminescence at the Turn of the Millenium*. Stephen Albrecht, Tomas Zimmerman and Herbert Brandl (eds.) SCHWEDA-WEBERDRUCK GmbH, Druckerei & Verlag, Dresden, 2001, pp. 130-135.

15c. Dragoui MS, Giurginca M. The dependence of the kinetic parameters of chemiluminescence on the biochemical and hematologic factors determined from the blood of the persons exposed to electromagnetic fields. *REVISTA DE CHEMIE*. 2005; 56(10):1036-1039.

2. Bochev P, **Bechev B** and Magrisso M. Six-sample multiplexing computerized analyzer for integral and spectral luminescence measurements. *Anal Chim Acta*. 1992; 256: 29-32. (IF-3,186)

1c. Mottola, HA, Pérez-Bendito D. Kinetic Determinations and Some Kinetic Aspects of Analytical Chemistry. *Analytical Chemistry*. 1994; 66 (12):131-162.

2c. Silva M. Tutorial review - Recent strategies in automated reaction rate based determinations. *The Analyst*.1993; pp. 681-688.

3c. Silva M. Recent strategies in automated reaction-rate based determinations  
Conference Information: SAC 92: international conf on analytical chemistry / 150th anniversary of the founding of laboratory of the government chemist / symp on spectroscopy across the spectrum, sep 20-26, 1992 Reading, England.

3. Bochev P, **Bechev B**, Magrisso M. Influence of magnetic field on phagocyte activation. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*. 1992; 27:45-48. (IF-2,992)

(списанието е преименувано - *Journal of Electroanalytical Chemistry*, Volume 342, Issue 1, February 1992, Pages 45-48)

1c. Zhang S, Wei W, Tao H, Zhang J, Mao Y. Monitoring the inhibitive effect of the static magnetic field on the activity of lysozyme with acoustic wave impedance analysis technique. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2004; 19 (5):441-447. DOI: 10.1080/14756360410001733720

2c. Zhang S, Wei W, Zhang J, Mao Y, Liu S. Effect of static magnetic field on growth of *Escherichia coli* and relative response model of series piezoelectric quartz crystal. *Analyst*. 2002; 127(3):373-377. Cited 22 times. DOI: 10.1039/b109617f

3c. Zhang J, Wei W. Magnetic field effect on the electrochemical behavior of hemoglobin. *Electroanalysis*. 2001;13(10):888-890. Cited 4 times. DOI: 10.1002/1521-4109(200106)13

## IX. СПИСЪК НА КЛЮЧОВИТЕ НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИЯТА

### Участия в международни научни форуми

**Bechev B.** Evaluation activity of leukocytes by cellular chemiluminescence as a diagnostic tool. Poster in: European Medical Physics and Engineering Conference incorporating XIth National Conference of Biomedical Physics and Engineering and VIth European Conference of Medical Physics, 18-20 October, 2012, Sofia, Bulgaria

**Bechev B, Stoff S, Trifonova N, Dimitrova D,** Role of neutrophils in inflamed microcirculation. *5th Eurosummer School on Bio rheology and Symposium on Micro and Nanomechanics and Mechanobiology of Cells, Tissues and Systems*. September 1<sup>st</sup>-5<sup>th</sup>, 2015, Varna, Bulgaria

P. Bochev, **B. Bechev**, M. Magriso. "Influence of magnetic field on phagocytes activation and activity", in second international school "Electromagnetic fields and biomembranes", 2-8 oct. 1988, Plevен.

### Участия в национални научни форуми

З. **Б. Бечев**, М. Магрисо. "Идеен проект за софтуерно и хардуерно осигуряване на компютърна система за хемилуминесцентен анализ", в XII научна сесия на студентите и младите научни работници, 1988г., ВМИ - Плевен. I Награда

П. Бочев, **Б. Бечев**, "Апарат за измерване на фагоцитарна активност на кръвни клетки", VII научна сесия на ВМИ, 1988 г., Плевен.

**Бечев Б.**, Бочев П., Магрисо М., Дилкова М. (1989) Компютърна система за определяне опсоно-фагоцитарна активност, Първа национална конференция по медицинска кибернетика. Варна, България, 16-18.10.1989.

P. G. Bochev, **B. G. Bechev**, M. J. Magriso. An apparatus for metabolic activity assessment of neutrophils, *Scientific Works of the Medical University Plevен*, 1991; 13 (1): 20-23.

М. Магрисо, **Б. Бечев** "Използуване на "Правец-82" за обработка и анализ на експериментални данни", X научна сесия на студентите и младите научни работници, ВМИ - Плевен, 1987 г. – наградена.

Bochev P., **Bechev B.** Approximation of experimental data by spline functions. V National conference on biomedical physics and engineering with international participation. 14-16 oct., Sofia. Abstracts of the Fifth National Conference on Biomedical Physics and Engeneering, 1988; p.3-4

Магрисо М., **Бечев Б.**, Бочев П. (1989) Програмен пакет за последователна обработка на данни. Първа национална конференция по медицинска кибернетика. Варна, България, 16-18.10. 1989.

**Б. Бечев**, М. Магрисо, М. Александрова, В. Маркова, П. Бочев. Симултантност при спектрални кинетични измервания на Zymosan стимулирана целокръвна хемилуминесценция Обединена научна сесия на студенти и млади научни работници. Пловдив, 18 април 1992 г.

**B. Bechev**, M. Magrisso, M. Alexandrova, V. Markova, P. Bochev Effects of ПМН and RBC count on the kinetics of whole blood luminol chemiluminescence. 9th Balkan Biochemical and Biophysical Days, Thessaloniki, Greece, 21-23 May 1992.

**Б. Бечев**, М. Магрисо, "Манипулация на фамилия криви, получени при кинетични измервания", XII научна сесия на студентите и младите научни работници, 1988г., ВМИ - Плевен.

**Бечев Б.**, Магрисо М. Предварителна обработка на графични данни от биологични експерименти, XII в научна сесия на студентите и младите научни работници, 1988 г., ВМИ - Плевен.

**Б. Бечев**, М. Магрисо. "Анализ на криви - приложение за определяне на фагоцитарна активност на левкоцити", XII научна сесия на студентите и младите научни работници, Плевен, 1988г.,.

**Б. Бечев**, М. Магрисо, М. Александрова, В. Маркова, П. Бочев. Метод за изследване нативна ХЛ на ПМН в цяла кръв стимулирани със Zymosan – постановка на проблема. Трета научна конференция на младите учени “Съвременни тенденции в развитието на фундаменталните и приложни науки”, Стара Загора, 1992 г.

**B. Bechev**, M. Magrisso, M. Alexandrova, V. Markova, P. Bochev, I. Benchev. Chemiluminescent spectrum of activated neutrophils in whole blood. 10th Balcan Biochemical and Biophysical Days, Varna, 22-25 May 1994.

**B. Bechev**, V. Markova, M. Alexandrova, M. Magrisso, P. Bochev, R. Velkov, A. Stojanova, J. Ivanov Estimation of Leukocytes Activity of Patients with Pleural Effusion by Chemiluminescent Method. 11 th BBBD – Balkan Biochemical Biophysical Days, May 15-17, 1997 Thessaloniki, Greece.

**Б. Бечев**, В. Маркова, М. Александрова, М. Магрисо, П. Бочев, Р. Велков, А. Стоянова, Я. Иванов Функционално състояние на левкоцитите при пациенти с емпиема, оценено с хемилуминесцентен метод. Научна сесия 23 години ВМИ – Плевен, 15-17 май 1997 г.

**B. Bechev**, M. Magrisso, V. Markova, M. Alexandrova, P. Bochev. Chemiluminescent Method for Estimation the Leukocytes Activity in Plural Effusion. Third International Symposium of Bulgarian Lipid League – 3-4.10.1997, Sofia

**B. Bechev**, V. Markova, M. Alexandrova, M. Magrisso, P. Bochev, R. Velkov, A. Stojanova, J. Ivanov. Estimation of Leukocytes Activity in Patients with Pleural Effusion with Different Ethiology. Third International Symposium of Bulgarian Lipid League – 3-4.10.1997, Sofia

**Бечев Б.**, М. Магрисо, М. Александрова, В. Маркова, П. Бочев, Р. Велков, А. Стоянова, Я. Иванов. Може ли хемилуминесценцията да се използва при изследване на

плевралната течност ? 25 години Медицински университет – Плевен, Юбилейна Научна сесия – 1999 г.

**Б. Бечев**, П. Бочев, В. Маркова, М. Александрова, Р. В., А. Стоянова, Я. Иванов. Използване оценката на активността на левкоцити с ХЛ тест за диагностични цели при плевралните изливи - XII Научна сесия на ВМИ Плевен 16-18.05.2002 г.

Bochev P., Magriso M., **Bechev B.** Effect of amplitude-modulated alternating magnetic field on phagocyte activation, Scientific Works of Higher Medical Institute Plevan, 1990; 12( 2): 9-12

**Бечев. Б.**, Александрова М, Маркова В, Бочев П, Иванов Я, Павлов П, Глоговска П, Стоянова А, Тодорова А, Колева Р. Диференциране на трансудати / ексудати и оценка патологичните процеси при пациенти с плеврален излив на базата на хемилуминесцентно изследване активността на левкоцити. Юбилейна научна конференция 30 години ВМИ – Плевен, October 15<sup>st</sup> -17<sup>th</sup>, 2004, Плевен

## **Х. РАЦИОНАЛИЗАЦИИ**

1. Бочев П., Бечев Бл., Магрисо М., Дилкова М. Шест-канален компютърен хемилуминометър, Рационализация, Рег.№ 8 / 12.03.1990г.
2. Бочев П., Бечев Бл., Магрисо М. Хемилуминометър с компютърна обработка и анализ на данни, Рационализация, Рег.№10 / 14.05.1990г.
3. Бочев П., Бечев Бл., Магрисо М. Устройство за спектрални луминесцентни измервания, Рационализация, Рег.№ 9 / 16.04.1990г.

## **ХІ. ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКИ ПРОЕКТИ, помогнали на дисертацията**

1. “Приложение на хемилуминесцентен метод при изследване на пациенти с плеврални изливи”.– 2003-2004 г., (Ръководител на проекта Б. Бечев) Проект финансиран от ВМИ-Плевен.
2. “Активност на периферни фагоцити при остър хеморагичен инсулт. Връзка с нивото на холестерола, С-реактивния протеин и редокс-баланса на кръвта”.– 2003-2004 г., Проект финансиран от ВМИ-Плевен.

## **XII. ДЕКЛАРАЦИЯ ЗА ОРИГИНАЛНОСТ**

### **ДЕКЛАРАЦИЯ**

от Благовест Георгиев Бечев  
докторант в Медицински Университет - София  
Катедра „Медицинска физика и биофизика“

Декларирам, че представената дисертация „Развитие и приложение на методите за клетъчна хемилуминесценция за изследване функционалното състояние на фагоцитиращи клетки в биологични течности“, във връзка с провеждането на процедура за придобиване на образователна и научна степен „доктор“ в Медицински Университет - София е мой труд и в нейното разработване не са използвани чужди публикации и разработки в нарушение на авторските им права. Цитиранията на всички източници на информация - текст, илюстрации, таблици, изображения и други, са обозначени според стандартите. Проведеното дисертационно изследване представя оригинални резултати и приноси и те не са заимствани от изследвания и публикации, в които нямам участие.

## **XIII. SUMMARY**

In the work is explored one of the main components of the immune system - the polymorph nuclear population (PMN). During elaboration of different chemiluminescent methods with appliance of some for diagnostic purposes it has been analyzed the functional state of the phagocytic cells in different body fluids- blood and pleural punctures.

There have been created and approved applicable apparatus, hardware and software resources necessary for integral and spectral chemiluminescent research work, inclusively for in vivo/in vitro monitoring of chemiluminescence in blood flow. The elaborated chemiluminescent systems - characteristics are high sensitivity and possibility for spectral measurements of ultra-low chemiluminescence.

The elaborated methodology for studies of the functional state of the leukocytes in whole blood by luminol-activated chemiluminescence is with widened range for standardization in relation to the number of the PMN and erythrocytes count. This expands the scope of investigated patients with neutropenia and of samples with strong diminished count of PMN and broad variability of RBC as well.

The spectral chemiluminescent studies of the functional state of fractioned PMN and leukocytes from whole blood are in agreement with the results from other authors and they are giving prop for the correctness of the method for kinetic spectral research and for the good characteristics of the created luminometer as well.

The elaborated and approved system for in vivo monitoring of chemiluminescence in extra corporal blood circulation were with follow up for the reaction after infusion of Zymosan in the blood flow. There are mentioned possible applications, e.g. sepsis research, effect of magnetic field over blood flow etc. It was determined change in the functional state of PMN during in vitro influence of amplitude-modulated magnetic field.

For the first time was created a methodology to study the functional state of PMN in pleural effusions by stimulation of the PMN with Zymosan as well as analyzing of the acquired kinetic chemiluminescence responses. Differentiation of transudative and exudative effusions was approved and test in clinics.

The extremely high sensitivity of the used chemiluminescence methods, the low-test price and the relatively simple and not very expensive equipment will contribute the diagnostics, the more adequate treatment and assessment of some pathological processes related to the patient's clinical state.

### **Благодарности**

Благодаря на колектива от катедрата по Физика в МУ Плевен, в който изработих основната част от дисертацията – М. Магрисо, М. Александрова, М. Маринов, В. Маркова, П. Бочев, майстора Иван и М. Дилкова, както и на традициите и опита, заложен от проф. С. Рибаров. Благодаря и на колектива от лекарите в Клиниката по пневмология и фтизиатрия, осигурили ми необходимите пациенти за изследванията, както и нужните дискусии – д-р Р. Велков, д-р Я. Иванов, д-р П. Глоговска и др.

Благодаря на научния си ръководител проф. Трайков и на М. Трайкова за ползотворните обсъждания по структурата и по някои раздели на дисертацията.

Финализацията на този труд би била невъзможна без активното участие на М. Магрисо и С. Стоев.

Благодаря и на всички колеги от катедрата ми по Медицинска физика и биофизика, МУ София, подкрепили ме, както и на колегите от катедрата по биология – проф. Н. Трифонова и проф. Д. Димитрова.

И естествено на подкрепата и спокойствието, които ми осигури семейството и близките приятели.