УДК 577. 27 : 599

НОВИЙ НАПРЯМОК ПАТОГЕНЕТИЧНОГО АНАЛІЗУ ІМУННОЇ СИСТЕМИ ССАВЦІВ

Фролов О.К., Омельянчик Л.О., Новосад Н.В., Федотов Є.Р., Грицаєнко Ю.М., Лупиніс О.В., Копійка В.В.

Зараз у клінічній імунології продовжує використовуватися група методів, що іменуються як методи першого /орієнтаційного/ та другого /аналітичного/ рівнів дослідження, що відносяться до емпіричного підходу оцінки стану імунної системи людини [1]. Більша частина їх відноситься до кількісних, наприклад, методи визначення вмісту популяцій та субпопуляцій лімфоцитів у периферичній крові. Тому їх показники слабо корелюють з функціональним станом імунної системи, клінічними показниками. У той же час більшість функціональних методів (РБТЛ на мітогени та антигени, визначення цитотоксичної активності натуральних кілерів) є по своїй суті пробірочними. Отже, вони визначають тільки потенцію імунокомпетентних клітин до дії. Дані методи також не висвітлюють міграційні відмінності окремих популяцій лімфоцитів. Є дані, що напрямок динаміки міграції лімфоцитів та амплітуда змін їх у крові та інших компонентах внутрішнього середовища залежить від тропності патологічного процесу, стадії захворювання, терапії, що проводиться, періоду реконвалесценції та інших факторів [2, 3]. Тому коливання рівня тестованих лімфоцитів у периферичній крові в бік збільшення чи зменшення не свідчить однозначно про стимуляцію або супресію імунних процесів в організмі.

У цьому зв'язку емпіричні імунологічні методи можуть застосовуватися тільки при групових обстеженнях населення або ж хворих за усередниними показниками та результативні при значних зрушеннях в імунітеті, які відносяться вже до імунопатології. Однак для проведення імуноаналізу в окремих індивидів, єдино необхідного для оцінки стану імунітету у фізіологічних та патологічних процесах, розробки імунореабілітаційної терапії, контролю за її ефективністю, емпіричні методи вже мало ефективні.

Отже, актуальною проблемою сучасної клінічної імунології є розробка та введення патогенетичного підходу до аналізу стану імунної системи, заснованого на тестуванні окремих етапів імуногенеза [4]. Нами розроблений новий напрямок у даному патогенетичному підході - аналіз стану імунної системи організму людини за рівнем новоутворених лімфоцитів у процесі гісто- та імуногенезу та їх міграції у внутрішньому середовищі організму (в плазмі крові, тканинній рідині, лімфі).

Перспективність даного напрямку базується на основних функціях імунної системи та механізмах їх реалізації. Так, імунна система разом з нервовою та ендокринною системами контролює гуморальний (антигенний склад внутрішнього середовища) та морфологічний (антигенний склад тканин, органів) компоненти антигенструктурного гомеостазу (АСГ). Конституційні особливості АСГ даного організму визначаються його генотипом. Тому імунна система в кінцевому рахунку контролює його фенотипичний ефект на всіх етапах онтогенезу. Контроль та регуляцію АСГ імунна система здійснює в процесі виконання цензорної та морфогенетичної функцій. При цьому цензорна функція здійснюється шляхом впізнавання та усунення чужих антигенів під час цитотоксичних імунних реакцій (кілінг, фагоцитоз) [5]. Морфогенетична функція реалізується шляхом впізнавання аутоантигенів та наступної регуляції метаболізму, проліферації, диференцірovки (гістогенез) клітин всіх тканин, що несуть ці структури, під час росту, розвитку організму, фізіологічної та репаративної регенерації [6, 7]. Безперервний контроль і регуляція АСГ на всіх етапах онтогенезу з боку імунної системи передбачає постійний лімфоцитопоез у центральних та імуногенез у периферичних органах, що забезпечують наробку клонів сенсибілізованих лімфоцитів, інтенсивність яких відповідає конкретній імунологічній ситуації, що склалася в організмі. Свої цензорні або морфогенетичні реакції клони лімфоцитів здійснюють в органах у процесі направленої міграції через клітини високого ендотелія посткапілярних венул (ВЕПВ) [8]. Показана органна та системна перевага міграції, рециркуляції окремих популяцій лімфоцитів. Так, наприклад, пул рециркулюючих Т-лімфоцитів складається з двох різних за специфічністю рециркуляції субпопуляцій : перша включає єдину локальну імунологічну систему слизових, що поєднує кишечник, бронхи, молочні залози, слизові оболонки, лімфоїдні фолікули коньюктиви, генитального тракту та ін.; друга - лімфоїдну систему периферичних лімфатичних вузлів. Така перевага міграції обумовлена особливостями рецептор-лігандних взаємовідношень мігруючих лімфоцитів через ВЕПВ даної органної локалізації [9].

Таким чином, рівень новоутворення клонів сенсибілізованих лімфоцитів і активність їх подальшої міграції в органи, а також об'єм загальної рециркуляції популяцій лімфоцитів у внутрішньому

середовищі організму відображають функціональний стан імунної системи організму. Новий патогенетичний напрямок заснований на групі методів, що тестують в циркулюючих лімфоцитах остаточні признаки їх активації в лімфоїдних органах. Виявлено чотири ознаки, які характерні для клонів активованих лімфоцитів серед популяцій циркулюючих лімфоцитів : частота асоціацій акроцентричних хромосом; розмір клітин; авидність Т-лімфоцитів до еритроцитів барану; інтенсивність люмінесценції лімфоцитів, флуорохромованих акридиновим оранжевим (АО). Ці ознаки стали основою для розробки відповідних методів :

1) цитогенетичного - за аналізом частоти класів лімфоцитів (КЛ) без асоціацій акроцентричних хромосом (КЛ 0 ААХ) та з двома акроцентриками в асоціаціях (КЛ 2 ААХ), в сумі (КЛ 0+2 ААХ) [2, 10];

2) цитоморфометричного - за аналізом частоти КЛ з діаметром до 6,0 мкм (КЛ≤6,0мкм) [11, 12];

3) авідного розеткового - за аналізом частоти КЛ, які приєднали більше 8 еритроцитів барана (КЛ≥8 ЕБ) [13,14];

4) люмінесцентного - за аналізом інтенсивності люмінесценції (І) в умовних одиницях (у.о.) при довжині хвилі 640 нм (І 640 нм) лімфоцитів, флуорохромованих акридиновим оранжевим [15, 16].

Динаміка активованих класів лімфоцитів у системі "периферійна кров - імунна система - периферійна кров" представлена на рисунку. Характеристика та розрішальна здатність патогенетичних імунологічних методів приведені нижче.

ЦИТОГЕНЕТИЧНИЙ МЕТОД

У каріотипі людини є 10 акроцентричних хромосом : 6 великих (група D) і 4 маленьких (група G). В їх коротких плечах знаходяться ядерцеві організатори, до складу яких входить до 50 генів рРНК, що повторюються. Завдяки гомологічності короткі плечі акроцентричних хромосом в інтерфазі зближуються (асоціюють), утворюючи загальне ядерце. Асоціації акроцентричних хромосом (ААХ) у лімфоцитах реєструють у метафазі мітозу, при стимуляції їх у культурі поліклональними мітогенами. Аналіз ААХ у першому мітозі співпадає з їх частотою в інтактному, циркулюючому в організмі лімфоциті, так як при цьому зберігається вихідна архітектоніка розташування хромосом в ядрі. У циркулюючих лімфоцитах кількість асоціюючих АХ коливається від 0 до 10 і прямо пропорційна довжині інтерфази (періоду між діленнями), тобто довжині життя лімфоцита після його утворення. У лімфоцитах, довгоциркулюючих в організмі людини, кількість асоціюючих АХ наближається до максимуму - 10, у новоутворених в результаті імуногенезу клітинах їх частота знижується до мінімуму 0 або 2-х. Причина зниження асоціюючих АХ полягає в тому, що частина їх (25% за мітотичний цикл) руйнується в процесі руху хромосом при мітозі, а за короткий період інтерфази між клітинними діленнями зруйновані асоціації не встигають відновитися. Стимульовані до імуногенезу лімфоцити в периферичних лімфоїдних органах проходять в залежності від імунологічної ситуації 4-10 клітинних ділень. Згідно з представленою формулою уже після 3-4 мітозів лімфоцити втрачають асоціації АХ. Тому виходячі в загальну рециркуляцію новоутворені лімфоцити будуть відноситись до класу лімфоцитів (КЛ) без асоціацій та з двома асоціюючими акроцентриками, за рахунок їх мінімальної реасоціації (КЛ 0+2 ААХ). За своєю імунологічною характеристикою це ранні постпроліферативні активовані лімфоцити. Класи лімфоцитів, до складу яких входить велика кількість асоціюючих АХ (КЛ 3-1- ААХ), відносяться до довгоциркулюючих. Їх імунологічна активність відзначалась в минулому і передбачається в майбутньому при відповідній зустрічі з антигеном, мітогенній стимуляції. Отже, за частотою КЛ 0+2 ААХ серед циркулюючих лімфоцитів можна оцінювати інтенсивність проліферації та міграції активованих лімфоцитів в організмі людини. Використання різних мітогенів для стимуляції лімфоцитів у культурі дозволяє оцінювати функціональний стан окремих субпопуляцій лімфоцитів. Фітогемаглютинін (ФГА) є мітогеном для більшості Т-лімфоцитів; конканавалін А (КОН А) - для неспецифічних Е-супресорів; мітоген лаконоса (МЛ) здійснює Т-залежну стимуляцію більшості В-лімфоцитів; туберкулін (Туб) - частини В-лімфоцитів.

АВІДНИЙ РОЗЕТКОВИЙ МЕТОД

Метод заснований на здатності Т-лімфоцитів людини за допомогою відповідних рецепторів спонтанно приєднувати еритроцити барану (Е-РУК) з утворенням фігур, названих розетками : у центрі лімфоцит, кругом ЕБ. За розеткоутворюючий приймається Т-лімфоцит, що приєднав 3 і більше ЕБ. У людни даний рецептор невеликої щільності та авідності виявлений на фібробластах, гранулоцитах, натуральних кілерах (НК). При звичайних методах забарвлення розеток НК важко відокремити від середніх та великих лімфоцитів. Однак дана обставина не впливає вагомим чином на достовірність авідного розеткового методу для Т-лімфоцитів, так як частота НК серед циркулюючих лімфоцитів невисока - 2-10%, а авідність до ЕБ низька - 3-5 ЕБ на клітину [17]. В-лімфоцити людини рецептора до ЕБ не мають. Даний рецептор відноситься до СД2-структури мембрани, функція якої ще недостатньо вивчена. В СД2-структурі виявлено 3 сайта. Один з них комплементарний до антигенів ЕБ, два інших - до білків мембран клітин високого ендотелія посткапілярних венул (ВЕПВ). Комплементарність рецептора Т-лімфоцитів до

антигенів ЕБ випадкова. У природі такої взаємодії не спостерігається. Є підстави вважати, що через даний сайт СД2-структури здійснюється ліганд-рецепторна антиген-незалежна передача сигналу до бластної трансформації та проліферації лімфоцитів на ранніх етапах імуногенезу, а останні два сайта приймають участь у міграції лімфоцитів через клітини ВЕПВ. У дослідах in vivo і in vitro показано, що після мітогенної та антигенної стимуляції щільність на мембранах Т-лімфоцитів СД2 зростає, з'являються лімфоцити з великою кількістю приєднавшихся до них ЕБ, названих "морулами" або "мегарозетками" [14, 18]. Отже, підвищена щільність СД2 на циркулюючих в організмі Т-лімфоцитах є остаточною ознакою їх попередньої активації в периферичних лімфоїдних органах при імуногенезі. Наші експериментальні дослідження показали, що серед циркулюючих Т-лімфоцитів, класи лімфоцитів, що приєднали 8 і більше ЕБ (морули і мегарозетки), відносяться до активованих і за їх частотою можна оцінювати в динаміці стан Т-клітинної системи.

ЦИТОМОРФОМЕТРИЧНИЙ МЕТОД

Метод засновано на двох цитологічних особливостях. По-перше, на зміні морфології, а саме, розмірів лімфоцитів під час лімфоцитопоезу в центральних органах та імуногенезу в периферичних органах імунної системи; по-друге, на гетерогенності лімфоцитів за довжиною рециркуляції в організмі після їх утворення. Виходячи з вказаних особливостей весь циркулюючий пул лімфоцитів чітко поділяється на 3 структурно-функціональні групи : малі (до 6,0 мкм), середні (7-9 мкм) та великі (10 і більше мкм) лімфоцити. Попередніми дослідженнями нами показано, що класи лімфоцитів (КЛ) з діаметром клітин до 6,0 мкм (КЛ≤6,0 мкм), які знаходяться в циркулюючому пулі, є ранніми постпроліферативними зрілими активованими Т- і В-лімфоцитами з високою міграційною активністю. Ці класи лімфоцитів, в основному, утворилися в результаті серії мітотичних ділень при імуногенезі. Основна кількість довгоциркулюючих лімфоцитів, що зберігають потенції до імуногенезу, мають середній діаметр 7-9 мкм, обумовлений тканиноспецифічним ядерно-цитоплазматичним відношенням. У периферичних лімфоїдних органах вказані лімфоцити в результаті аутоантигенних і антигенних, а також мітогенних стимулів активуються, трансформуються в імунобласти (більше 10 мкм в діаметрі), у цитоплазмі яких розвертається білок-синтетична система. Потім вони послідовно мітотично діляться 6-10 раз. Кількість мітозів залежить від конкретної імунологічної ситуації в організмі. Під час наступних одне за одним ділень діаметр клітин зменшується за рахунок цитоплазми, яка не встигає відновитися за час коротких інтерфаз. Проліферація лімфоцитів є обов'язковою фазою імуногенезу, під час якої іде також і їх диференціровка в ефекторні та регуляторні клітини, а також клітини пам'яті. Утворені малі лімфоцити активно включаються в рециркулюючий пул лімфоцитів, для чого їх малий розмір біологічно виправданий : сприяє кращій міграції, так як вона здійснюється, в основному, через цитоплазму клітин високого ендотелія посткапілярних венул (ВЕПВ) за допомогою рецептор-лігандного піноцитоза. У період міграції у внутрішньому середовищі організму КЛ≤6,0 мкм стають доступними для аналізу як активовані лімфоцити, тому за їх динамікою, наприклад в периферичній крові, можна судити про напряг імунітету. У процесі рециркуляції малих лімфоцитів їх діаметр відновлюється до оптимального (7-9 мкм), характерного тканиноспецифічному ядерно-цитоплазматичному відношенню.

У довгоциркулюючих, старіючих лімфоцитах діаметр клітин збільшується, імовірно, за рахунок втрати регідності цитоскелетних структур клітини, порушення осморегуляції. Такі клітини складають пул так званих "широкоплазмових" великих лімфоцитів діаметром більше 10 мкм. Вони мають компактне хроматизоване ядро з широким обідком світлої бідної ергастоплазмою цитоплазми. Однак у групу великих лімфоцитів, крім вказаних вище, відносяться і інші клітини : натуральні кілери й імунобласти. Натуральні кілери мають велике слабкохроматинове ядро, широкий обідок цитоплазми містить азурофільні гранули [17]. Згідно з останніми даними, їх гістогенез незалежний від лімфоцитарного і має в кістковому мозку власні вторинні стволові клітини. Циркулюючі натуральні кілери знаходяться на кінцевій стадії диференціровки і втрачають потенцію до наступної проліферації.

Імунобласти не пройшли всі етапи диференціровки при імуногенезі, тому мають ядро з дифузним хроматином, ядерцями, широку базофільну цитоплазму. Вони з'являються в периферичній крові внаслідок інтенсифікації імунітету і підвищеного розходу імунокомпетентних клітин на імунні реакції, і, по аналогії з гранулопоезом, можуть розглядатись як зрушення формули крові вліво. Їх розмір коливається в широких межах 8-10 і більше мкм.

Таким чином, за кількістю КЛ≤6,0 мкм і співвідношенню малих, середніх і великих лімфоцитів у загальній рециркуляції можна об'єктивно оцінювати стан імунної системи на момент обстеження.

ЛЮМІНЕСЦЕНТНИЙ МЕТОД

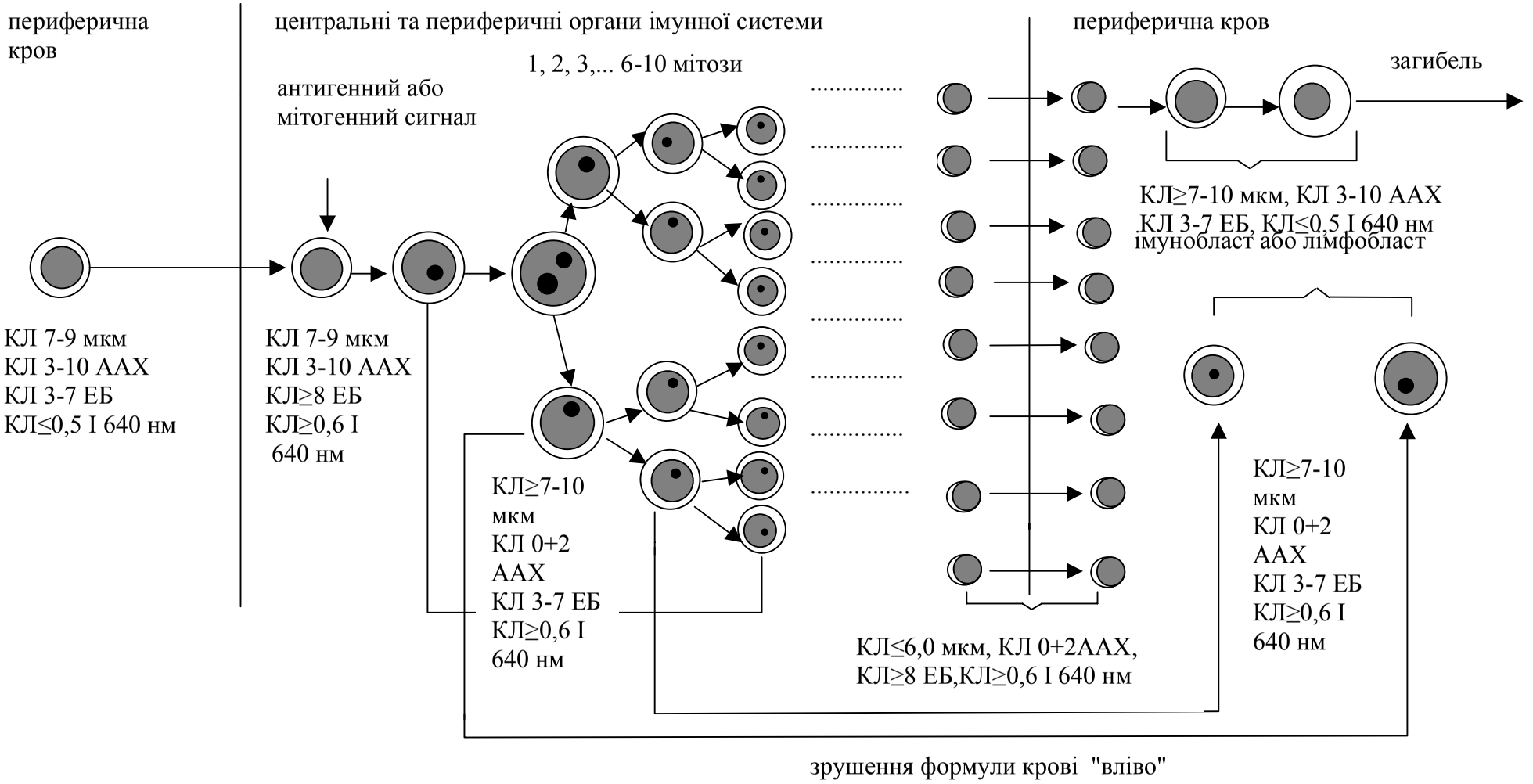
Для визначення функціональної активності лімфоцитів люмінесцентним методом зручно застосовувати двохвильовий флуорохром акридиновий оранжевий (АО). Його мономери поєднуються з дволанцюговими нуклеїновими кислотами (НК) - переважно ДНК і ділянки РНК у функціональних укладках, а димери - з одноланцюговими НК, переважно РНК і ділянки метаболічно активних (транскрипція, редуплікація) ДНК. У спектрі збудження 436 нм мономери флуоресцирують у максимумі

довжини світлової хвилі 530 нм (зелений колір), димери - 640 нм (червоний колір). Оцінку інтенсивності люмінесценції фіксованих клітин на мазках та гістологічних препаратах оцінюють за допомогою люмінесцентного мікроскопа з фотомножувачем в умовних одиницях. Експериментально доведено, що АО у фіксованих лейкоцитах при pH 4,0-6,0 вибірково адсорбується на НК [19]. При збільшенні біосинтетичних процесів у клітині інтенсивність люмінесценції (I) в спектрі 640 нм (I 640 нм) підвищується, так як в ній збільшується кількість одноланцюгових НК. При зниженні метаболічної активності конденсація хроматину та його двохланцюговість збільшується, тому інтенсивність люмінесценції здвигається в максимум 530 нм. Прийнято за відношенням I 640 нм до I 530 нм, що має назву А-параметр, визначати метаболічну активність клітин [20]. Однак для циркулюючих лейкоцитів А-параметр має мале застосування, так як всі клітини вийшли з мітотичного циклу і знаходяться в G_0 стадії життєвого цикла. У цей період синтез НК в них знаходиться на мінімальному рівні або взагалі відсутній, а ДНК в ядрі максимально конденсується (росте дволанцюговість). Тому в імунологічно активних лейкоцитах синтетичні процеси ідуть за рахунок різних видів РНК, що накопичені в мієлоїдних та лімфоїдних тканинах при відповідних гістогенезах та імуногенезі.

Зроблений висновок підтверджується нашими попередніми дослідженнями [16] про слабку і недостовірну варіацію I 530 нм у клітинних популяціях конкретного виду лейкоцитів (лімфоцитах, нейтрофілах), тоді як I 640 нм у цих клітинах коливалась в широких межах і змінювалась пропорційно антигенній та мітогенній дії на імунну систему. У цьому зв'язку А-параметр не дає однозначної характеристики функціональної активності конкретної клітини або групи клітин крові, лімфи, ексудата. Будучи відносним показником (I 640 нм : I 530 нм), він може бути низьким при високих значеннях I 640 нм і I 530 нм в початкові періоди активації клітин і високим при низьких їх значеннях.

Попередні наші дослідження показали, що лімфоцити з I 640 нм рівній 0,6±0,03 у.о. і більше є активованими. Їх частота в периферичній крові донорів дорівнює 31,2%±2,6% (КЛ≥0,6 I 640 нм).

Динаміка популяцій активованих лімфоцитів в лімфоцитопоезі та імуногенезі.



Примітка : КЛ - клас лімфоцитів, ААХ - асоціації акроцентричних хромосом, ЕБ - еритроцити барану, І 640 нм - інтенсивність флуоресценції в умовних одиницях при довжині хвилі 640 нм.

Динаміку появи в рециркулюючому пулі внутрішнього середовища організма активованих лімфоцитів чотирьох популяцій (КЛ 0+2 ААХ; КЛ≤6,0 мкм; КЛ≥8 ЕБ; КЛ≥0,6 І 640 нм) демонструє схема лімфоцитопоеза та імуногенеза. До активованих при даному методологічному підході відносяться заново надходячі в рециркуляцію зрілі лімфоцити з діаметром клітини 4-6 мкм, а також незрілі імунобласти або лімфобласти. Крім цитоморфометричних ознак попередньої активації, вони містять і інші її риси : цитогенетичні, авідні розеткові і люмінесцентні.

Лімфоїдна система - найдинамічніша за клітинним складом. Тому інтерпретацію отриманих показників частот різних популяцій активованих лімфоцитів необхідно проводити з урахуванням таких особливостей імуногенезу. По-перше, основні імуногенетичні етапи, такі як бластна трансформація, проліферація, диференціровка, міграція лімфоцитів стереотипні при будь-якому порушенні АСГ. Тому пропоновані методи оцінки інтенсивності новоутворення лімфоцитів не можуть бути діагностичними для конкретної патології. Вони лише відображають функціональний стан імунної системи. По-друге, отримані показники частот різних популяцій активованих лімфоцитів необхідно інтерпретувати з позицій не тільки їх утворення, а й міграційних властивостей у внутрішньому середовищі організму, інтенсивність яких залежить від функціональних особливостей конкретної субпопуляції активованих лімфоцитів, а напрямок міграції - від локалізації патології (периферійні чи внутрішні органи); стадії захворювання та його клінічної форми (депонування в органах чи повернення у вільну рециркуляцію); характера патогенетичної терапії, яка впливає на процеси новоутворення та міграції лімфоцитів. Крім того, слід брати до уваги вік обстеженого та його конституційні особливості. У цьому зв'язку повну характеристику стану імунної системи дає обстеження хворого в динаміці у комплексі з клінічними даними та порівнюючи попередні імунологічні показники з наступними, так як конституційні імунологічні особливості лімфоцитів мають виражену індивідуальну варіабельність.

З позицій патогенетичного напрямку аналізу стану імунної системи за новоутворенням активованих лімфоцитів та їх наступною міграцією в організмі можливо по новому підійти до осмислення здвигів імунологічних показників у людей при фізіологічних та патологічних станах. Так, більшість кількісних та функціональних змін лімфоцитів крові (виключаючи уроджені імунодефіцити), обумовлені не явищем стимулювання чи інгібірування імунітету як загальнобіологічної гомеостатичної властивості організму, а, відповідно конкретній імунологічній ситуації на момент обстеження, різним рівнем співвідношення новоутворення лімфоцитів, тривалістю та напрямком їх міграції в організмі, депонуванням у патологічних органах чи в органах з високою функціональною активністю.

ЛІТЕРАТУРА

1. Петров Р.В., Лопухин Ю.М., Чередеев А.Н. и др. Оценка иммунного статуса человека при массовых исследованиях: метод. рекомендации МЗ СССР. - М., 1984.-24 с.
2. Фролов А.К., Арцимович Н.Г., Сохин А.А. Иммуноцитогенетика. - М.: Медицина, 1993. - 240 с.
3. Cahill R.N.P., Tranka Z. Grouht and development of recirculating lymphocytes in the sheep fetees. - Assays Anatomy and Phisiol., Limphoid. Tissues. - Bassel, 1980. - vol. 16. - p.38 - 49.
4. Ковальчук Л.В.,Чередеев А. Н. Патогенетический принцип оценки иммунной системы человека: дальнейшее развитие. //Клиническая лабораторная диагностика.- 1995. - № 6. - С.78-80.
5. Ломакин М.Г. Иммунологический надзор. - М.: Медицина, 1990. - 256с.
6. Бабаева А.Г. Лимфоциты как регуляторы пролиферации и дифференцировки клеток нелимфоидных органов. - Вестник АМН СССР. - 1990. №2 - с.43-45.
7. Донцов В.И. Иммунология постнатального развития. - М..: Наука, 1990. - 180с.
8. Bishop D.K., Jutila M.A., Sedmark D.D., et al. Lymphocyte enlry into inflammantory tissues in vivo. - J. Immunol. - 1990. - V.142. - P.4219 - 4224.
9. Biehenstock J. - Gut and bronchus associated lymphoid tissue: an overview. Vivo Immunol Histophisiol. Limph. syst. Proc. 7th Int. Conf. Limph. Tissues and Germin. Cent. Immune Neaction, Groningenn, 15-19 June, 1981, New-York - London, 1982, 471-477.
10. Фролов А.К., Фролов В.К. Способ определения активированных Т-лимфоцитов. А.с. СССР 1024839 А. Бюлл. 1983, №23
11. Фролов А.К., Арцимович Н.Г., Москалец О.В. и др. Цитогенетические и цитоморфометрические параллели лимфоцитов человека. // Генетика.- 1993. - т.29. - №4. - с. 3-7.
12. Фролов А.К., Арцимович Н.Г., Москалец О.В. и др. - Способ определения активированных лимфоцитов в крови. Гос. патент, RU 2080597 С1. Бюл. 1997.№15.

13. Фролов А.К. Иммуноцитопоэтические признаки циркулирующих лимфоцитов человека при патологических состояниях // Цитология и генетика. - 1994. - Т.28. - №4. - с.3-7.

14. Фролов А.К., Шипитяк Е.Г., Негусторова А.Ф. и др. - Способ определения активированных Т-лимфоцитов в организме человека. Патент РФ № 2080598, С1. Бюл., 1997, №15.

15. Фролов А.К., Шифрин Г.А., Федотов Е.Р., Грицаенко Ю.М. - Люминесценция лейкоцитов крови, флуорохромированных акридиновым оранжевым, оперированных больных в динамике анестезиологического и хирургического стресса. Цитология и генетика. - 1998. - Т. 31. В печати.

16. Фролов А.К., Федотов Е.Р., Грицаенко Ю.М. и др. - Спосіб визначення активності білоксинтетичної системи клітин крові. Рішення про видачу патенту на винахід № 96104073, МПК-6 G01N 33/48.

17. Семененя Н.И. Естественные киллерные клетки как звено в иммунной системе организма // Иммунология. - 1991. - № 4. - С. 4-6.

18. Ju David Tar Jan. - Human lymphocyte subpopulation: gigant human red blood cell rossetes. - J. Immunol. Meth., 1977. - V.15.- №1. - P.67-76.

19. Зеленин А.В. Люминесцентная цитохимия нуклеиновых кислот.- М.: Наука, 1974. - 184с.

20. Карнаухов В.Н. Люминесцентный спектральный анализ клетки. - М.: Наука, 1978. - 207с.