

МОДИФИКАЦИЯ РЕАКЦИИ БЛАСТТРАНСФОРМАЦИИ ЛИМФОЦИТОВ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В АЛЛЕРГОЛОГИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

И.В. Манина¹, В.Ю. Сергеев¹, Н.В. Голубцова², А.Ю. Сергеев³

¹Институт Аллергологии и клинической иммунологии; Россия, 123104 Москва, ул. Малая Бронная, 20, стр. 1;

²ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

³ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет); Россия, 119991 Москва, ул. Большая Пироговская, 2, стр. 4

Контакты: Ирина Владимировна Манина Irina.v.manina@gmail.com

Введение. Реакция бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) востребована для обследования пациентов с иммунологическими нарушениями. Она применяется в различных областях медицины для выявления сенсибилизации к антигенам (аллергенам).

Цель исследования — провести модификацию и автоматизацию РБТЛ для применения в рутинной лабораторной практике.

Материалы и методы. РБТЛ, антигены (аллергены). Программное обеспечение Windows 7; процессор Intel Pentium G4500. Цифровая КМОП-видеокамера, микроскоп «Микмед-6».

Результаты. Мы провели анализ трудностей при постановке РБТЛ в лабораторной аллергологической практике и разработали компьютерную программу для автоматизации РБТЛ.

Заключение. Мы адаптировали и автоматизировали реакцию РБТЛ для применения в лабораторной диагностике.

Ключевые слова: реакция бласттрансформации лимфоцитов, аллергены, методика, автоматизация

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-2-88-92

LYMPHOCYTES BLAST-TRANSFORMATION REACTION: MODIFICATION FOR ALLERGOLOGICAL PRACTICE

I. V. Manina¹, V. Yu. Sergeev¹, N. V. Golubtsova², A. Yu. Sergeev³

¹Institute of Allergology and Clinical Immunology; Bldg 1, 20 Malaya Bronnaya St., Moscow 123104, Russia;

²N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

³I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia (Secheniv University); Bldg 4, 2 Bol'shaya Pirogovskaya St., Moscow 119991, Russia

Introduction. Lymphocytes blast-transformation reaction (RBTL) is necessary for patient's inspection with immunologic infringements. It is applied in the different fields of medicine to identification of a sensitization to antigens (allergens).

Research objective — to modify and automate RBTL for application in routine laboratory practice.

Materials and methods. RBTL, antigens (allergens). Software: Windows 7; Intel Pentium G4500 CPU. Digital CMOS video camera, Mikmed-6 microscope.

Results. We analyzed difficulties when using RBTL in laboratory allergological practice. We created program files for automation of RBTL.

Conclusion. We adapted and automated RBTL for laboratory diagnostics using.

Keywords: lymphocytes blast-transformation reactions, allergens, technique, automation

Введение

Реакция бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) разработана в 1960–1970 гг., однако до сих пор не потеряла своей актуальности [1]. На сегодняшний день РБТЛ востребована при обследовании пациентов с иммунологическими нарушениями в различных областях медицины для выявления сенсибилизации к антигенам (аллергенам). Накопленный опыт ее

применения привел к необходимости ее модификации и автоматизации.

В качестве основы метода используется способность сенсибилизированных лимфоцитов переходить в форму бластов под действием сенсибилизировавшего их антигена [2].

В настоящее время РБТЛ востребована для обследования пациентов с иммунологическими нарушениями

в различных областях медицины, чаще всего во фтизиатрии, ревматологии, иммунологии, аллергологии [3]. РБТЛ используется специалистами для оценки клеточного звена иммунитета при подозрении на иммунопатологическое состояние, для оценки функциональной активности лимфоцитов, для выявления клеточной сенсibilизации. Исследуют общую способность лимфоцитов человека к бласттрансформации под действием ФГА или антигена, а также к спонтанной бласттрансформации (без митогена).

Реакция спонтанной бласттрансформации возможна у пациентов в следующих случаях: воспалительный процесс любой этиологии, заболевания крови, состояние после массивного инвазивного вмешательства, состояния после облучения (в том числе повышенный радиационный фон), использование препаратов, влияющих на процессы кроветворения, а также другие воздействия, приводящие к стрессовой реакции иммунной системы [4].

В аллергологии данный метод используется для подтверждения или выявления сенсibilизации к антигенам (аллергенам). РБТЛ является наиболее точной при подозрении у пациентов гиперчувствительности замедленного типа, которая может наблюдаться как при контакте с инфекционным антигеном, так и при аллергических реакциях. Метод особенно важен при диагностике медикаментозной сенсibilизации [5]. Метод РБТЛ при отсутствии других способов диагностики позволяет анализировать возможные риски развития аллергических реакций.

Цель работы — провести модификацию и автоматизацию РБТЛ для применения в рутинной лабораторной практике.

Материалы и методы

Методика постановки реакции бласттрансформации лимфоцитов

1. Для постановки реакции у больного берут 5–10 мл крови в пробирку, содержащую 100–200 ЕД гепарина, перемешивают и помещают на 60 мин в термостат при 37 °С для осаждения эритроцитов.

2. Надосадочный слой плазмы с лимфоцитами отсасывают в стерильную пробирку. Для оптимальной активации необходимо наличие небольшого числа макрофагов (моноцитов), поэтому не рекомендуется использовать высокоочищенные препараты лимфоцитов.

3. Определяют число лимфоцитов в 1 мкл надосадочного слоя.

4. Взвесь лимфоцитов разводят питательной средой 199, так чтобы в 1 мл содержалось 1–2 млн лимфоцитов. Оставшуюся аутоплазму используют в дальнейшей работе для приготовления питательной среды для культивирования лимфоцитов данного пациента, разводя средой 199.

5. Приготовленную лимфоцитарную взвесь разливают в стерильные флаконы по 1 мл и добавляют необходимое количество антигена.

6. Флаконы помещают в термостат ($T = 37\text{ °C}$) до 72 ч максимум. Более длительное время инкубации не рекомендуется во избежание ложноположительной реакции.

7. Готовят мазки на стеклах и подсчитывают количество лимфоцитов, перешедших в бластную форму, по отношению к общему числу лимфоцитов.

8. Параллельно следует провести отрицательный контроль (т. е. по аналогичной схеме культивировать лимфоцитарную взвесь без добавления антигена в среду), так как возможны реакции спонтанной (неспецифической) бласттрансформации. В качестве положительного контроля можно использовать реакцию на неспецифический митоген (фитогемагглютинин) по аналогичной схеме.

9. Рассчитывают результаты по формуле: определяют количество бластных клеток на 1000 клеток общего количества, после чего рассчитывают процент. Полученный результат сравнивают с контрольными образцами, культивированными при аналогичных условиях без добавления аллергена.

Формула расчета:

$$I(\%) = \text{Бл} / (\text{Лц} + \text{Бл}),$$

где: $I(\%)$ — индекс процентного соотношения бластных клеток в образце;

Бл — бластные клетки в образце;

Лц — лимфоциты в образце.

Реакцию можно считать положительной при 5–35 % бластных клеток от общего числа клеток по сравнению с контрольным (отрицательным) образцом.

Мы не рекомендуем проводить окрашивание мазков в связи с последующим подсчетом на электронно-вычислительных машинах. Красящие пигменты формируют нежелательный фон и лишние структурные элементы, что затрудняет настройку контрастности/освещенности микроскопа и фотоаппарата.

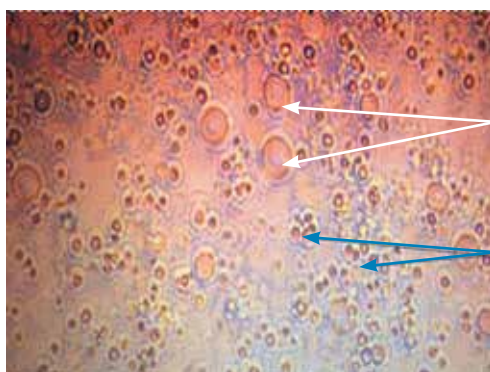
Для упрощения и автоматизации обработки полученных данных мы разработали компьютерную программу, проводящую подсчет результата исследования с фотоснимков образцов предметного стекла в режиме online. В основу программных файлов автоматической дифференцировки клеток (лимфоцитов и бластных форм) мы положили их морфологические различия [6, 7].

Морфологические характеристики лимфобластов и лимфоцитов при микроскопии

В таблице представлены морфологические характеристики лимфобластов и лимфоцитов.

Морфологические характеристики лимфобластов и лимфоцитов при микроскопии

Лимфобласты	Лимфоциты
Размер достигает 20–22 мкм. Ядро занимает большую часть клетки и имеет округлую или слегка овальную форму. Структура ядра нежно-сетчатая (хотя и более грубая, комковатая по сравнению с ядром миелобластов), с правильным, равномерным распределением хроматиновых нитей. Местами хроматиновые нити образуют утолщения. Темные участки базихроматина незаметно переходят в оксихроматин. В ядре имеется 1 (реже 2–3) крупное ядрышко, менее резко отграниченное, чем у миелобластов, расположенное центрально или эксцентрично. Цитоплазма базофильная, относительно светлая, окружает ядро узким пояском, вокруг ядра имеется более светлая периферическая зона, не всегда равномерно переходящая в более интенсивно окрашенную. Зернистости в цитоплазме нет	Размер чаще 7–10 мкм. Ядро круглое, овальное, иногда бобовидное. Структура ядра грубая, чаще состоит из грубых комков базихроматина и оксихроматина, создавая впечатление глыбчатости. Ядро окрашивается в темно- или светло-фиолетовый цвет, в нем иногда обнаруживаются небольшие светлые участки, имитирующие ядрышки. Цитоплазма лимфоцита светло-синяя с просветлением вокруг ядра. Часть лимфоцитов имеет в цитоплазме азурофильную зернистость, окрашивающуюся в красный цвет. Ободок цитоплазмы может иметь различные размеры, в связи с чем лимфоциты делят на 3 группы: узкоцитоплазмённые, среднецитоплазмённые и широкоцитоплазмённые



Лимфобласты

Лимфоциты

Рис. 1. Микроскопия взвеси лимфоцитов и лимфобластов в культуральной среде

На рис. 1 представлены результаты микроскопии взвеси лимфоцитов и лимфобластов в культуральной среде. Различия клеток не вызывают сомнений, что делает возможным их подсчет в автоматическом режиме.

Результаты

Сложности постановки реакции бласттрансформации лимфоцитов в клинической практике

Несмотря на более чем 30-летний период использования, сохраняются определенные трудности при постановке данной реакции.

1. Метод достаточно трудоемок в связи с проведением реакции в 2 этапа: постановка реакции с предшествующей подготовкой образца и подсчет/анализ полученных результатов врачом-лаборантом.

2. Отсутствуют стандартизированные аллергены для многих диагностикумов медицинского (лекарственные препараты, материалы для протезирования и прочее) или бытового применения (ингредиенты косметических средств, средств бытовой химии, синтетических изделий, строительных материалов и т. д.). Однако потребность и необходимость в диагностике сенсibilизации человека к таким объектам

возрастает пропорционально развитию промышленной индустрии и синтезу новых материалов.

3. Необходимость стерилизации помещения и диагностического образца (для предотвращения инфицирования культуры клеток при длительном сроке инкубирования). Возможность применения антибиотиков и противогрибковых препаратов крайне нежелательна во избежание ложноположительных результатов. Данная проблема решается с помощью стерилизации образца. Выбор способа стерилизации/дезинфекции зависит от состава исследуемого вещества (УФ-облучения, обработки спиртом и проч.).

4. Возможность ошибки при обработке результатов врачом-лаборантом вручную под контролем зрения в связи с человеческим фактором. Данная проблема решается с помощью автоматизации подсчета результатов с помощью компьютера.

Программное обеспечение подсчета бластных клеток для реакции бласттрансформации лимфоцитов

Нами было разработано программное обеспечение для автоматизации подсчета лимфоцитов и лимфобластов в подготовленных образцах по стандартному протоколу. Препараты представляли собой неокрашенные мазки обогащенной лимфоцитами сыворотки крови на предметном стекле в разведении. Проводилась световая микроскопия на лабораторном микроскопе «Микмед-6» (ЛОМО, г. Санкт-Петербург). Для получения цифрового изображения поля зрения на микроскоп была установлена цифровая КМОП-видеокамера с разрешением 8 Мп, использовался штатный объектив микроскопа $40 \times 0,65$.

На рис. 2 представлены исходное фото образца и фото после его программной обработки.

Программное обеспечение работает под управлением операционной системы Windows 7 на персональном компьютере с процессором Intel Pentium G4500, тактовая частота 3,5 ГГц. Изображение передается в реальном времени на монитор лаборанта,

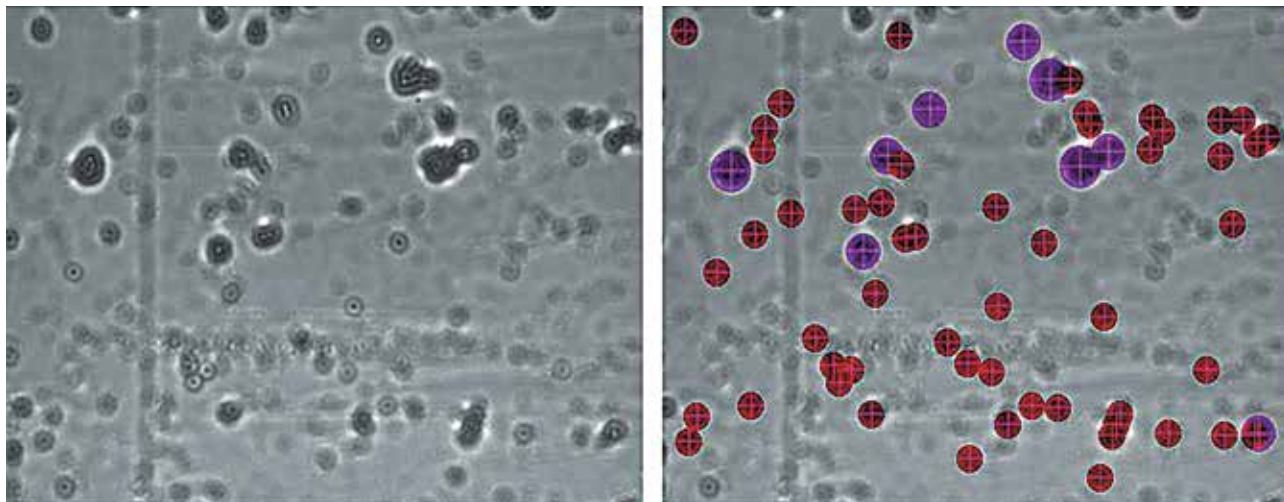


Рис. 2. Программная обработка результатов реакции бласттрансформации лимфоцитов

необходимая четкость изображения контролируется микровинтом микроскопа. По нажатию клавиши производятся автоматическое распознавание и подсчет числа лимфоцитов и лимфобластов на фотоизображении.

Для распознавания использовались 6 моделей (3 модели лимфоцита, 3 модели лимфобласта) клеток, в которых учитывались их размер, форма и структура (яркость участков). В целом лимфобласты описывались как более крупные клетки с равномерной бледной окраской. Процесс распознавания занимал примерно 8 с и отображался на экране для возможности контроля лаборантом.

Для повышения достоверности исследования автоматический подсчет проводился в нескольких полях зрения с наличием клеток и без артефактов по всей площади мазка. В среднем обсчитывалось 5 полей зрения. Исследование прекращалось при превышении числа распознанных клеток 1000, рассчитывалось процентное соотношение числа лимфобластов к общему числу лимфобластов и лимфоцитов. Результаты регистрировались в электронной карте.

Требования к образцам для тестирования

В связи с необходимостью тестирования аллергенов разнообразного состава и консистенции мы разработали рекомендации для отбора и подготовки диагностических образцов для исследования.

1. Твердые субстраты (не растворимые в биологических жидкостях и воде) необходимо стерилизовать с помощью автоклавирования (или ультрафиолета). Стерильные образцы можно вводить в культуру клеток в неизменном виде. Однако нами отмечено, что в данном случае основное взаимодействие лимфоцитов с аллергеном происходит непосредственно на диагностическом образце, что затрудняет оценку

реакции. Следует максимально снимать клетки с твердофазного диагностикума, иначе часть бластных форм остается «прилипшей» к образцу.

2. Твердые образцы, растворимые в биологических жидкостях или воде, следует предварительно развести с соблюдением стерильности до получения однородной жидкой структуры.

3. Жидкие образцы аллергенов при введении в культуру клеток нужно разводить в среде 199. Для избежания цитотоксичного эффекта жидкий диагностический образец необходимо титровать. Мы использовали следующие разведения: 1/25, 1/50, 1/100, 1/200 (использовать менее 3 разведений аллергена нецелесообразно в связи с малой информативностью получаемого результата). Не исключено токсическое действие примесей в диагностическом материале. При оценке результата каждый образец сравнивался с контрольным.

4. При возможности точного пересчета добавляемого образца необходимая концентрация неинфекционного аллергена должна составлять 1000 PNH в 1 мл, лекарственного вещества — 10 мкг в 1 мл.

5. Использование аэрозольных, масляных, эмульсионных, кремовых и прочих субстанций для постановки РБТЛ непригодно в связи с невозможностью технического исполнения протокола методики.

6. Тестирование многокомпонентных образцов (растворы, смеси, сплавы и прочее) может быть сопряжено со сложностью интерпретации результатов. Не исключается токсическое действие примесей. При оценке полученного результата важно учитывать особенности фармакокинетики и фармакодинамики медикаментов и их метаболитов. У пациентов с полипрагмазией важен грамотный сбор анамнеза врачом-аллергологом перед проведением обследования [8, 9].

7. Тестирование бактериальных, вирусных, грибковых субстанций (равно как и инфицированных образцов) нецелесообразно в связи с прямым инфекционно-токсическим действием. Например, шерсть/перхоть/другие биологические субстраты животных, нестерильные жидкости (использованные косметологические или медицинские средства и прочее) непригодны для диагностики в связи с невозможностью провести стерилизацию без изменения молекулярной структуры.

8. Забор материала крови у пациента должен производиться при отсутствии воспалительного процесса любой этиологии. В период воспаления возможны реакции неспецифической трансформации, что делает невозможным получение правильной оценки результата РБТЛ. С момента последнего периода болезни (острого состояния или обострения хронического) должно пройти не менее 7 дней.

9. Для получения адекватных результатов исследования кровь пациента должна быть использована в кратчайшие сроки с момента забора (не более 1 сут хранения при физиологических условиях). Пациент и врач должны быть предупреждены, что использование иммунокорректирующих средств (как стимулирующих, так и супрессантов) накануне исследования может исказить результаты теста.

Заключение

РБТЛ имеет высокую диагностическую ценность в качестве дополнительного критерия верификации аллергических реакций или выявления сенсibilизации у пациентов. Разработанная нами модификация и автоматизация РБТЛ существенно снижает трудозатратность метода и повышает качество результатов, что позволяет ее внедрять в рутинную лабораторную практику.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Сохин А.А., Чернушенко Е.Ф. Прикладная иммунология. К.: Здоровье, 1984. 320 с. [Sokhin A.A., Chernushenko E.F. Applied immunology. Kiev: Zdorovye, 1984. 320 p. (In Russ.)].
2. Ройт А. Основы иммунологии. М.: Мир, 1991. С. 281–285. [Roitt A. Fundamentals of immunology. Moscow: World, 1991. P. 281–285 (In Russ.)].
3. Чернушенко Е.Ф. Иммунологические методы в диагностике туберкулеза. Лабораторная диагностика 2005;2:63–6. [Chernushenko E.F. Immunologic methods in diagnosis of tuberculosis. Laboratory Diagnostika = Laboratory diagnostics. 2005;2:63–6 (In Russ.)].
4. Авербах М.М., Гергерт В.Я., Литвинов И.В. Повышенная чувствительность замедленного типа и инфекционный процесс. М.: Медицина, 1974. 248 с. [Averbakh M.M., Gergert V.Ya., Litvinov I.V. Hypersensitivity of delayed type and infectious process. Moscow: Meditsina, 1974. 248 p. (In Russ.)].
5. Тузлукова Е.Б., Царев С.В., Лусс Л.В. и др. Лекарственная аллергия и другие виды осложнений лекарственной терапии: от классификации к диагностике. Доктор.Ру. 2008;2:27–32. [Tuzlukova E.B., Tsarev S.V., Luz L.V. et al. Medicinal allergy and other of medicinal therapy complications: from classification to diagnostics. Doctor.Ru. 2008;2:27–32 (In Russ.)].
6. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. М.: Мир, 1969. 646 п. [Lillie R. Pathohistologic technique and practical histochemistry. Moscow: Mir, 1969. 646 p. (In Russ.)].
7. Елисеева В.Г., Субботина М.Я., Афанасьева Ю.И. и др. Основы гистологии и гистологической техники. М.: Медицина, 1967. 268 с. [Yeliseyeva V.G., Subbotin M.Ya., Afanasyeva Yu.I. et al. Fundamentals of histology and histologic technique. Moscow: Meditsina, 1967. 268 p. (In Russ.)].
8. Латышева Т.В., Прокопенко В.Д., Ильина Н.И. и др. Полипрагмазия как основная причина острых лекарственных осложнений. Материалы 4-го Российского национального конгресса «Человек и лекарство». Тез. докл. М., 1997. С. 71. [Latysheva T.V., Prokopenko V.D., Ilyina N.I. et al. Polipragmacy as main reason for acute medicinal complications. 4th Russian national congress "Person and medicine". Thesis of reports. Moscow, 1997. P. 71 (In Russ.)].
9. Хаитов Р.М. Лекарственная аллергия. Методические рекомендации для врачей. М.: Фармуспринт медиа, 2012. 75 с. [Haitov R.M. Medicinal allergy. Methodical recommendations for doctors. Moscow: Pharmusprint media, 2012. 75 p. (In Russ.)].