СПРАВОЧНИК
ЗАВЕДУЮЩЕГО КДЛ

«АКТИОН» МЦФЭР

Проточная цитометрия

Практическое пособие

СОДЕРЖАНИЕ

Метод многопараметрической проточной цитометрии в диагностике и мониторинге множественной миеломы **2**
Пронкина Н.В., Шишкова И.В., Труфакина Е.В.

Возможности проточной цитометрии для оценки апоптоза при сердечно-сосудистых заболеваниях **16**
Гайковая Л.Б., Лобанова О.А., Матущенко А.И., Кухарчик Г.А., Ермаков А.И., Дмитриева В.П.

Применение метода проточной цитометрии для диагностики аллергических заболеваний **27**
Бычкова Н.В.

Возможности метода проточной цитометрии в диагностике нарушений иммунной системы **36**
Пронкина Н.В., Шишкова И.В., Труфакина Е.В.

Оценка потерь лейкоцитов и эритроцитов в моче при центрифугировании с помощью метода проточной уроцитометрии **44**
Семикина Е.Л., Ходунова Т.В., Каманова Т.С.

Метод многопараметрической проточной цитометрии в диагностике и мониторинге множественной миеломы

Н.В. Пронкина
канд. биол. наук, заведующая лабораторией клинической иммунологии,

И.В. Шишкова
врач клинической лабораторной диагностики лаборатории клинической иммунологии,

Е.В. Труфакина
врач клинической лабораторной диагностики лаборатории клинической иммунологии

Клиника иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» («НИИФКИ»), г. Новосибирск

Статья посвящена рассмотрению современного состояния диагностики и мониторинга множественной миеломы. Обзор литературы последних лет указывает на особое значение применения метода проточной цитометрии. Согласно данным литературы, достижение иммунофенотипической ремиссии обладает прогностической ценностью для таких показателей, как продолжительность жизни без прогрессирования заболевания и общей продолжительности жизни, а также является наиболее релевантным прогностическим фактором у больных – кандидатов на аутотрансплантацию стволовых клеток. Авторы полагают, что иммунофенотипические методы определения минимальной остаточной болезни позволяют проводить сравнение эффективности различных лечебных подходов, подбирать индивидуальные режимы поддерживающей терапии и оценивать их эффективность в режиме непрерывного мониторинга.

За последние 20 лет парадигма лечения множественной миеломы (ММ) претерпела значительные изменения [9]. В течение долгого времени целью лечения являлось достижение частичной ремиссии или стабилизации заболевания [5]. Однако благодаря внедрению в клиническую практику высокодозной терапии с последующей аутотрансплантацией стволовых клеток (ВДТ/АТСК) появилась возможность достижения полной ремиссии примерно у 35% больных миеломой [3]. Следует отметить: ни стандартные, ни новые препараты не способны обеспечить полное уничтожение всех клеток миеломы, в результате рецидив развивается вследствие минимальной остаточной болезни (МОБ) у большинства больных.

Для разработки эффективных стратегий поддержки ремиссии необходимы чувствительные методы оценки эффекта терапии с целью определения оптимальной продолжительности лечения и поддержки больного в состоянии ремиссии в течение как можно более продолжительного времени. В гематологии считается практически общепринятым, что достижение и поддержание высококачественной ремиссии является первостепенным требованием положительного результата лечения.

к сведению

У больных миеломой полная ремиссия определяется как отсутствие М-протеина по данным иммунофиксации и присутствие менее 5% плазматических клеток в костном мозге [3].

Большинство исследований показали, что достижение полной ремиссии после лечения ассоциируется с увеличением продолжительности жизни без прогрессирования заболевания, однако в ряде работ указывается, что показатели полной ремиссии не всегда коррелируют с увеличением продолжительности жизни [3, 11]. Это несоответствие можно объяснить, по крайней мере отчасти, низкой чувствительностью метода морфологического подсчета плазматических клеток и высокой степенью вариабельности клинических проявлений как между больными, так в каждом конкретном случае. Также высказано предположение, что прогностическое значение достижения полной ремиссии может зависеть

от типа лечения, возраста и исходного состояния больного. В связи с этим можно считать, что данный критерий не обладает достаточной точностью для выявления больных, которым может принести клиническую пользу дополнительная терапия в ранние сроки после лечения [3, 14].

Международная рабочая группа по изучению миеломы (IMWG) предложила использовать новую категорию эффекта лечения – «строгая полная ремиссия», для которой требуется нормализация отношения свободных легких цепей в сыворотке крови (sFLC) и отсутствие клональных плазматических клеток по данным иммуногистохимического и флуоресцентного исследований.

внимание!

Важно отметить, что измерение уровня М-протеина и определение отношения свободных легких цепей в сыворотке периферической крови пациента отражает только количество продукта секретирующего клона, но не обеспечивает прямое количественное определение остаточной опухолевой массы. В связи с этим длительное время полужизни некоторых иммуноглобулинов, в частности – парапротеинов IgG, может обусловливать появление ложноположительного результата [4]. На данный момент уже подтверждена важность морфологического исследования костного мозга даже у больных с отрицательным статусом М-протеина после терапии. Однако, в отличие от острых лейкозов, стандартное морфологическое исследование костного мозга при ММ в общем случае не позволяет различать нормальные и злокачественные плазматические клетки, что снижает чувствительность цитологического анализа в период наблюдения [2].

Иммунофенотипирование методом многопараметрической проточной цитометрии (МПЦ) позволяет исследовать экспрессию и интенсивность флуоресценции большого числа маркеров на большом числе клеток.

Метод позволяет различать аномальные, нормальные и реактивные плазматические клетки, несмотря на низкий уровень этих клеток в костном мозге [12].

внимание!

Это уникальное качество присуще только данному методу, поскольку ни стандартные морфологические, ни молекулярные подходы по отдельности или вместе не обладают способностью различать клональные и нормальные плазматические клетки. Это очень важно, т. к. в дополнение к мониторингу опухолевых плазматических клеток иммунофенотипирование позволяет отслеживать восстановление нормальных плазматических клеток, а это является важной прогностической информацией. В контексте ММ и других аномалий плазматических клеток показана клиническая значимость МПЦ для дифференциального диагноза моноклональной гаммапатии неясного генеза (МГНГ) и ММ, выявления групп повышенного риска МГНГ, дремлющей ММ (дММ) и ММ [14].

Иммунофенотипический анализ плазмоцитов

Достижения в разработке аппаратуры и программного обеспечения для проточной цитометрии за последние годы привлекли внимание к использованию результатов иммунофенотипических исследований в лечении гемобластозов. МПЦ позволяет:

1. Одновременно анализировать несколько параметров на основе одной клетки.
2. Изучать большое число клеток в пределах относительно короткого промежутка времени, что позволяет хранить информацию для последующих анализов.
3. Проводить количественный анализ экспрессии антигенов.
4. Объединять выявление поверхностных и внутриклеточных антигенов [19].

Эти свойства позволяют идентифицировать, определять количество и характеризовать плазматические клетки даже при небольшом количестве клеток благодаря использованию различных маркеров и двухэтапной процедуре получения.

Установлено, что антигены CD38 и CD138 лучше всего подходят для специфической идентификации плазматических клеток в гематологических образцах и их определения на фоне других популяций лейкоцитов [17].

Несмотря на то что CD38 экспрессируется на большом числе гематопоэтических клеток, этот антиген считают

«специфическим» маркером благодаря высокой интенсивности окрашивания на плазматических клетках, которая выделяет эти клетки из других популяций [2]. В свою очередь окрашивание CD138 также считают специфичным, хотя встречаются плазматические клетки с низким уровнем экспрессии CD138 [11] и даже с полным отсутствием CD138 [1]. В связи с этим для эффективной идентификации плазматических клеток предлагается использовать оба маркера [2, 11]. Для идентификации нормальных и опухолевых плазматических клеток необходимо использовать маркеры плазматических клеток, экспрессия которых различна в норме и при патологии (табл. 1).

Таблица 1

Список информационных антигенов для определения злокачественных плазматических клеток при множественной миеломе [6, 7, 14, 15, 18]

Антиген	Уровень нормальной экспрессии на плазматических клетках костного мозга	Уровень аномальной экспрессии на плазматических клетках костного мозга
CD38	Высокий уровень экспрессии	Уровень экспрессии ниже (в сравнении с нормальными ПК)
CD45	Гетерогенная экспрессия	Отрицательная экспрессия
CD19	Положительная экспрессия	Отрицательная экспрессия
CD56	Отрицательная экспрессия	Высокий уровень экспрессии
CD117	Отрицательная экспрессия	Положительная экспрессия
CD27	Высокий уровень экспрессии	Отрицательная экспрессия
CD81	Положительная экспрессия	Отрицательная экспрессия
CD200	Слабоположительная экспрессия	Высокий уровень экспрессии

Таким образом, необходимо иметь иммунофенотипические панели, содержащие четыре и более маркеров в многоцветных комбинациях, а также панели антител в соответствии с перечисленными маркерами; это позволит выявлять наличие фенотипических аномалий более чем у 90% больных ММ [12]. Использование 8-цветных панелей позволяет выявлять клональные плазматические клетки у всех больных благодаря одновременной оценке рестрикции легких цепей и аберраций антигенов.

Панель моноклональных антител для выявления МОБ, используемая в нашей лаборатории, составляет две пробирки (табл. 2).

Таблица 2

Панель моноклональных антител для выявления МОБ

Пр-ка	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7	V450	V510
№ 1	CD38	CD56	CD27	CD117	CD138	CD81	CD19	CD45
№ 2	cytIgL	CD200	CD138	cytIgK	CD38		CD19	CD45

Последовательность пробоподготовки образца костного мозга для идентификации МОБ:

1. Образец костного мозга дважды отмыть в 10-кратном избытке забуференного физиологического раствора (ЗФР). Это необходимо для правильного окрашивания моноклональными антителами для идентификации свободных цепей иммуноглобулинов.

2. Образец костного мозга должен быть лизирован, чтобы популяция эритроцитов не мешала дальнейшему анализу. Реагенты для лизиса эритроцитов должны иметь маркировку IVD (InVitroDiagnostic). Выделение клеток на градиенте плотности недопустимо.

3. Выделение гейта плазматических клеток должно проводиться по трем маркерам: CD45, CD38, CD138, только в этом случае достигается оптимальная чистота выделения популяции плазматических клеток (рис. 1).

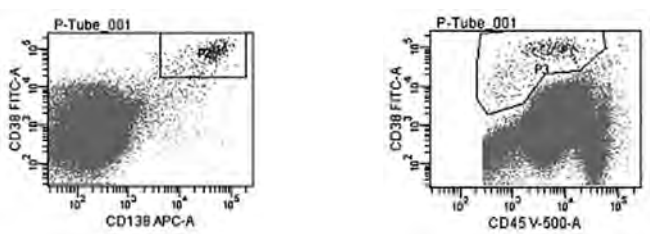


Рис. 1. *Выделение популяции плазматических клеток по трем маркерам*

4. Оценка экспрессии антигенов: минимальная панель моноклональных антител для идентификации плазматических клеток CD19, CD45, CD38, CD56 и CD138. CD81, CD27, CD117 и CD200 представляют дополнительную информацию для выявления патологических плазматических клеток

и по возможности должны быть включены в диагностическую панель антител (рис. 2).

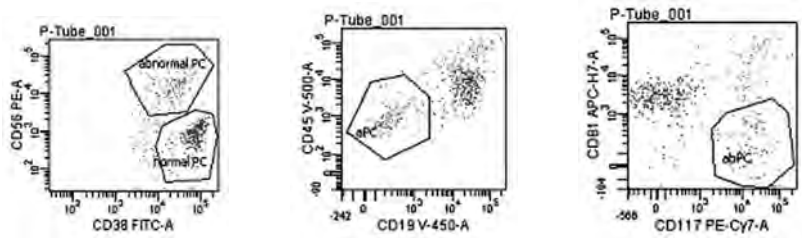


Рис. 2. *Выделения популяции нормальных плазматических клеток и клона злокачественных клеток*

5. Контроль: нормальные клетки, которые присутствуют в костном мозге, обеспечивают положительный и отрицательный контроль. Использование изотипического контроля не требуется.

6. В гейт плазматических клеток необходимо собрать минимум 100 событий. Для достижения чувствительности метода 0,01% необходимо собрать 1 000 000 клеток из образца.

7. Необходимо учитывать качество забранного образца костного мозга на наличие гемодилюции. Разведение образца костного мозга периферической кровью может искажать результат.

8. Цитоплазматическое окрашивание моноклональными антителами легких цепей иммуноглобулинов важно для идентификации моноклональности патологического клона плазматических клеток.

Чувствительность иммунофенотипирования для оценки МОБ при множественной миеломе

Чувствительность иммунофенотипирования напрямую зависит от минимального числа событий, необходимых для определения интересующей исследователя популяции, а оно, в свою очередь, определяется типом фенотипических аберраций, комбинации моноклональных антител, которые используются для детекции, и исследуемого образца [19].

Известно, что для правильного определения популяции требуется всего 20 событий. Однако в последних опубликованных рекомендациях European Myeloma Network [16] содержится указание на необходимость наличия не менее 100 не-

опластических плазматических клеток для точного анализа. В условиях нашей лаборатории в экспериментах с разведением нами показано, что иммунофенотипическая дифференциация нормальных и злокачественных плазматических клеток на основе МПЦ имела чувствительность более 10^{-4}. Применяя восьмицветную МПЦ, можно достигать уровня чувствительности аллель-специфическая ПЦР и даже превосходить его.

Потенциальные ограничения иммунофенотипирования в определении МОБ

По опыту применения проточной цитометрии для определения МОБ при других видах гемобластозов постоянно указываются два основных недостатка:

- отсутствие опухолеспецифических маркеров;
- появление в процессе развития заболевания фенотипических изменений, которые могут приводить к ложноотрицательным результатам.

Однако в контексте ММ злокачественные плазматические клетки достаточно легко идентифицировать на основе множественных и синхронно определяемых фенотипических аберраций, которые позволяют четко отграничить злокачественные клетки от нормальных. Таким образом, наиболее важное значение приобретает правильное составление разнообразных комбинаций моноклональных антител, также обязательным требованием является одновременная оценка экспрессии антигенов CD19, CD45 и CD56.

Тем не менее это не исключает появления фенотипических изменений после терапии. На самом деле такие изменения действительно имеют место, но, скорее всего, они связаны с другими типами маркеров, а не с теми, которые были перечислены выше. Соответственно, фенотипические аберрации, выявленные при постановке диагноза, могут использоваться как (антигенные) зонды, специфичные для конкретного больного, при определении МОБ в период последующего наблюдения.

Другим недостатком является тот факт, что иммунофенотипические исследования для определения МОБ исключительно сфокусированы на популяцию плазматических клеток костного мозга. Действительно важным ограничени-

ем проточной цитометрии при определении МОБ является характерная очаговая структура миеломной инфильтрации костного мозга [16, 18] и (или) возможность экстрамедуллярного рецидива, при котором методы визуализации могут играть очень большую роль в процессе мониторинга МОБ.

Категории ремиссии

Было показано, что достижение иммунофенотипической полной ремиссии коррелирует с более высокой выживаемостью без прогрессирования и более продолжительным временем до прогрессирования заболевания по сравнению с обычной полной ремиссией и строгой полной ремиссией. Также было показано, что молекулярный метод определения МОБ, метод иммунофиксации и цитометрический метод дают дополняющую друг друга информацию, поэтому необходимо разработать более точные критерии оценки эффекта при ММ. В совокупности все эти результаты указывают, что достижение иммунофенотипической ремиссии обладает большей клинической значимостью, чем достижение полной ремиссии, поскольку позволяет выделить группы больных с различным исходом [13]. Одним из недостатков определения полной ремиссии является зависимость этого эффекта от исходных клинических и биологических характеристик больных, тогда как статус МОБ по данным проточной цитометрии позволяет статистически значимо выделять пациентов с более благоприятным прогнозом (МОБ–) и менее благоприятным прогнозом (МОБ+) независимо от скорости пролиферации злокачественных плазматических клеток (S-фаза), уровней микроглобулинов β2 и статуса заболевания (ISS). Важную роль при данном заболевании играют цитогенетические исследования, группа испанских исследователей определяла прогностическое значение статуса МОБ в разных FISH-цитогенетических подгруппах риска. В подгруппе стандартного риска (отсутствие t (4;14), t (14;16) и del (17p); n = 81) продолжительность жизни без прогрессирования заболевания была больше у МОБ– больных по сравнению с МОБ+ [13]. Эти факты в совокупности указывают на необходимость уточнения критерия оценки эффекта терапии ММ, который должен включать с настоящего времени и далее новый – иммунофенотипический – статус.

Прогностический фактор, способный перспективно идентифицировать больных с неустойчивой полной ремиссией, – это наличие цитогенетических показателей высокого риска, выявленных методом FISH, и персистенция МОБ по данным проточной цитометрии на 100-й день после ВДТ/АТСК.

внимание!

Эти два лабораторных показателя являются единственными независимыми факторами предсказания неустойчивой полной ремиссии. Следовательно, эти два показателя позволяют идентифицировать больных в полной ремиссии с высоким риском раннего прогрессирования после ВДТ/АТСК, в лечении которых можно попробовать использовать новые препараты.

Последующий мониторинг минимальной остаточной болезни при множественной миеломе

В научном сообществе исследователей миеломы крепнет убеждение в том, что основной целью лечения на ближайшее будущее является перевод этого неизлечимого заболевания в хроническое состояние (особенно у лиц из группы низкого риска).

Хорошо известно, что это возможно только в случае достижения высококачественной устойчивой ремиссии. Соответственно, в последнем исследовании группы из Арканзаса показано, что для достижения длительной ремиссии важнее поддерживать полную ремиссию, а не достичь ее как можно раньше [8]. Поэтому необходимо определить режимы персонализированной поддерживающей терапии на основании индивидуальных уровней остаточного заболевания, а для этого необходимы методы, которые были бы одновременно высокочувствительными и легко осуществимыми. В этой связи некоторые исследования последовательного определения МОБ молекулярными методами показали, что этот вид анализа обладает значительной прогностической ценностью. Однако эти исследования проводились в небольших группах больных, что отражает незначительную степень их применимости и делает проточную цитометрию привлекательным

инструментом оценки эффекта лечения в течение длительного периода времени. Показано, что иммунофенотипирование является эффективным методом определения МОБ при миеломе на разных этапах лечения и что полученные этим методом результаты связаны с выживаемостью [13] (рис. 3).

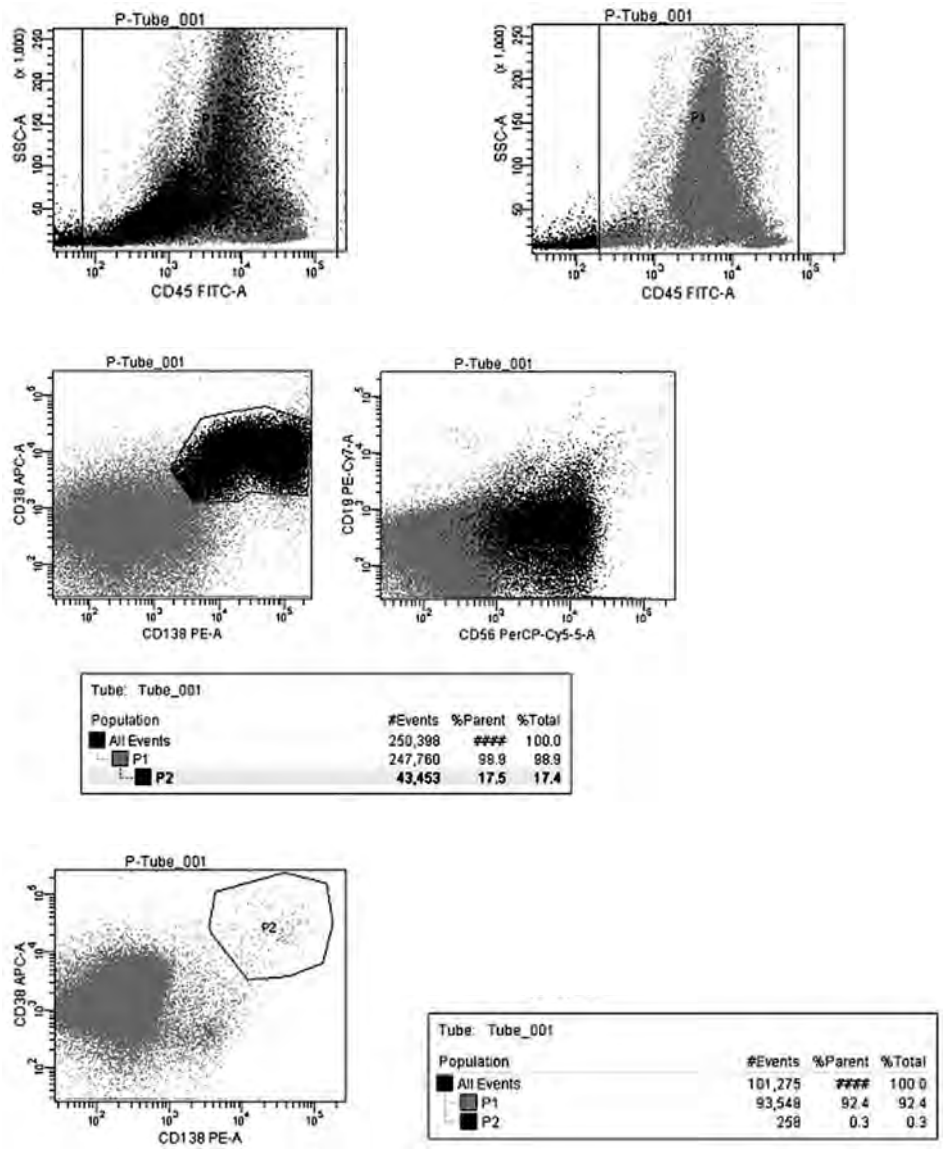


Рис. 3. *Идентификация клона злокачественных плазматических клеток методом проточной цитометрии при ММ до начала лечения и после курса химиотерапии*

Применение новых препаратов и потенциальное использование еще более новых сделает реальной индивидуализацию лечения на основе точного определения эффекта. В методических рекомендациях большое внимание уделено релевантности определения МОБ при миеломе; показано также, что проточную цитометрию можно считать методом выбора для такого определения. Иммунофенотипические методы определения МОБ позволяют проводить сравнение эффективности различных лечебных подходов, подбирать индивидуальные режимы поддерживающей терапии и оценивать их эффективность в режиме непрерывного мониторинга. Показано, что достижение иммунофенотипической ремиссии обладает прогностической ценностью для таких показателей, как продолжительность жизни без прогрессирования заболевания и общей продолжительности жизни, а также является наиболее релевантным прогностическим фактором у больных, которые являются кандидатами на АТСК. В этой связи IMWG недавно пересмотрела категорию «строгая полная ремиссия», для которой теперь требуется отсутствие МОБ по данным проточной цитометрии.

Список использованной литературы

1. Гальцева И.В., Давыдова Ю.О., Капранов Н.М., Джулакян У.Л., Менделеева Л.П. Роль и место проточной цитометрии в диагностике и мониторинге минимальной остаточной болезни при множественной миеломе // Онкогематология. 2017. № 2. С. 80–94.
2. Almeida J., Orfao A., Ocqueteau M. et al. High-sensitive immunophenotyping and DNA ploidy studies for the investigation of minimal residual disease in multiple myeloma // Br. J. Haematol. 1999. Vol. 107. P. 121–131.
3. Attal M, Harousseau J L. Role of autologous stem-cell transplantation in multiple myeloma // Best. Pract. Res. Clin. Haematol. 2007. Vol. 20. P. 747–759.
4. Blade J., Samson D., Reece D. et al. Criteria for evaluating disease response and progression in pa-tients with multiple myeloma treated by high-dose therapy and haemopoietic stem cell transplantation. Myeloma Subcommit-tee of the EBMT. European Group for Blood and Marrow Transplant // Br. J. Haematol. 1998. Vol. 102. P. 1115–1123.

5. Corso A., Nozza A., Lazzarino M. et al. Plateau phase in multiple myeloma: an end-point of conven-tional-dose chemotherapy // Haematologica 1999. Vol. 84. P. 336–341.
6. Dahl I.M., Rasmussen T., Kauric G., Husebekk A. Differential expression of CD56 and CD44 in the evolution of extramedullary myeloma // Br. J. Haematol. 2002. Vol. 116. P. 273–277.
7. Harada H., Kawano M.M., Huang N. et al. Phenotypic difference of normal plasma cells from ma-ture myeloma cells // Blood. 1993. Vol. 81. P. 2658–2663.
8. Hoering A., Crowley J., Shaughnessy J.D. et al. Complete remission in multiple myeloma ex-amined as time-dependent variable in terms of both onset and duration in Total Therapy protocols // Blood 2009. Vol. 114. P. 1299–1305.
9. Kumar S.K., Rajkumar S.V., Dispenzieri A. et al. Improved survival in multiple myeloma and the im-pact of novel therapies // Blood. 2008. Vol. 111. P. 2516–2520.
10. Lahuerta J.J., Mateos M.V., Martinez-Lopez J. et al. Influence of pre- and post-transplantation re-sponses on outcome of patients with multiple mye-loma: sequential improvement of response and achievement of complete response are associated with longer survival // J. Clin. Oncol. 2008. Vol. 26. P. 5775–5782.
11. Lin P., Owens R., Tricot G., Wilson C.S. Flow cytometric immunopheno-typic analysis of 306 cases of multiple myeloma // Am. J. Clin. Pathol. 2004. Vol. 121. P. 482–488.
12. Mateo G., Montalban M.A., Vidriales M.B. et al. Prognostic value of im-munophenotyping in multi-ple myeloma: a study by the PETHEMA / GEM cooperative study groups on patients uniformly treated with high-dose therapy // J. Clin. Oncol. 2008. Vol. 26. P. 2737–2744.
13. Paiva B., Vidriales M.B., Cervero J. et al. Multiparameter flow cytometric remis-sion is the most relevant prognostic factor for multiple myeloma patients who undergo autologous stem cell transplanta-tion // Blood. 2008. Vol. 112. P. 4017–4023.
14. Paiva B., Vidriales M.B., Mateo G. et al. The persistence of immunopheno-typically normal resid-ual bone marrow plasma cells at diagnosis identifies a good prognostic subgroup of symptomatic multiple myeloma patients // Blood 2009. Vol. 114. P. 4369–4372.
15. Rawstron A.C., Davies F.E., DasGupta R. et al. Flow cytometric disease monitoring in multiple myeloma: the relationship between

normal and neoplastic plasma cells predicts outcome after transplanta-tion // Blood. 2002. Vol. 100. P. 3095–3100.
16. Rawstron A.C., Orfao A., Beksac M. et al. Report of the European Myeloma Network on multi-parametric flow cytometry in multiple myeloma and re-lated disorders // Haematologica. 2008. Vol. 93. P. 431–438.
17. Rawstron A.C. Immunophenotyping of plasma cells. Curr.Protoc. Cytom. 2006. Chapter 6. Unit 6.23.
18. San Miguel J.F., Gutierrez N.C., Mateo G., Orfao A. Conventional diagnostics in multiple mye-loma // Eur. J. Cancer. 2006. Vol. 42. P. 1510–1519.
19. Vidriales M.B., San-Miguel J.F., Orfao A. et al. Minimal residual disease monitoring by flow cytometry // Best. Pract. Res. Clin. Haematol. 2003. Vol. 16. P. 599–612.

Возможности проточной цитометрии для оценки апоптоза при сердечно-сосудистых заболеваниях

Л.Б. Гайковая
д-р мед. наук, заведующая центральной клинико-диагностической лабораторией, заведующая кафедрой биологической и общей химии,

О.А. Лобанова
ст. преподаватель кафедры биологической и общей химии,

Г.А. Кухарчик
д-р мед. наук, проф. кафедры факультетской терапии,

А.И. Ермаков
врач клинической лабораторной диагностики центральной клинико-диагностической лаборатории,

В.П. Дмитриева
аспирант кафедры биологической и общей химии

ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России

В статье представлены возможности проточной цитометрии для оценки влияния убидекаренона и омега-3 полиненасыщенных жирных кислот на апоптоз у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями. Для оценки митохондриального механизма запуска апоптоза определяли мембранный потенциал митохондрий мононуклеарных лейкоцитов у 10 пациентов с хронической сердечной недостаточностью на фоне стандартной терапии с добавлением коэнзима Q10. Оценка рецепторного пути инициации апоптоза проводилась по количеству CD95+ лимфоцитов и фактора некроза опухоли-α в крови у 176 пациентов с инфарктом миокарда на фоне стандартной терапии с добавлением омега-3 полиненасыщенных жирных кислот. Показано, что у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями уменьшается апоптотическая активность клеток на фоне соответствующей терапии.

Существует много современных методов определения апоптоза [7]. Чаще всего они используются в научно-исследовательских лабораториях и требуют высокотехнологичного оборудования и квалификации персонала лаборатории. На наш взгляд, из современных технологий, используемых в клинико-диагностических лабораториях (КДЛ), для оценки апоптоза можно применять методы проточной цитометрии и иммуноферментного анализа (ИФА). Оборудование для этих методов получили многие лаборатории по программе модернизации здравоохранения.

Методами проточной цитометрии и ИФА можно определять разные механизмы инициации апоптоза и пути их реализации, которые тесно взаимосвязаны и могут переключаться с одного на другой. При этом конечным результатом апоптоза является нарушение проницаемости митохондриальной мембраны или активация эффекторных каспаз [11].

к сведению

Основные пути инициации апоптоза – рецепторный и митохондриальный [6] – оцениваются методом проточной цитометрии, активность проапоптотических белков и каспаз – методом ИФА.

Механизмы запуска апоптоза

Нарушение функции митохондрий клетки – универсальный признак апоптоза [15]. Любые события, происходящие на внешней мембране митохондрий, сопровождаются изменением проницаемости внутренней мембраны митохондрий для протонов H^+, что приводит к изменению мембранного потенциала митохондрий. Метод изучения мембранного потенциала с помощью проточной цитометрии основан на применении катионных липофильных красителей, способных проникать через билипидные мембраны (мембрану клетки, внешнюю и внутреннюю мембрану митохондрий) и накапливаться в областях с высокой концентрацией протонов, т. е. под внутренней мембраной митохондрий. Этот эффект сопровождается изменением флуоресценции клеток, что и регистрируют при применении проточной цитометрии [6].

В клетках при апоптозе происходят различные изменения, такие как повышение концентрации и активности про-

апоптотических белков (семейства Bcl-2), функций митохондрий (нарушение мембранного потенциала, выход в плазму цитохрома С и других белков, увеличение концентрации в цитоплазме активных радикалов кислорода), запуск в цитоплазме каскада каспаз и др.

Ключевая роль в активации запуска апоптоза в случае рецептор-зависимого пути принадлежит инициирующей каспазе-8, при митохондриальном сигнальном пути – каспазе-9. Оба пути направлены на активацию каспазы-3 – одной из основных эффекторных каспаз, основными мишенями которой являются белки и ферменты, отвечающие за фрагментацию ДНК.

Процесс апоптоза может инициироваться и внешними сигналами, которые одна клетка передает другой. Роль сигнальных молекул играют некоторые цитокины – фактор некроза опухоли α (TNF-α), TNF-β, фактор роста нервов и др. Важным элементом механизма апоптоза являются рецепторы клетки, способные взаимодействовать с указанными цитокинами. После соединения с этими рецепторами их лиганд, активированный домен смерти, при посредстве сложной ферментной системы осуществляет автокаталитический процессинг прокиназ, которые в свою очередь активируют киназы. Клетки способны «слущивать» с себя экстрацеллюлярную часть рецепторов – «растворимые рецепторы». Появляющиеся в межклеточном пространстве молекулы TNF прочно соединяются с ними и уже не могут воздействовать на реальные клеточные рецепторы смерти. Рецептор CD95 экспрессируется на поверхности многих клеток и при взаимодействии с FasL лигандом приводит к апоптозу клетки. FasL – цитокин, относящийся к семейству TNF, существует в нерастворимой и растворимой форме.

к сведению

Различные провоспалительные цитокины (TNF-α и др.), каспазы (каспаза-3, 8, 9 и др.), белки (AIF, цитохром С и др.) можно определять методом ИФА при наличии соответствующих наборов реагентов.

В связи с тем, что изучение процессов апоптоза кардиомиоцитов у человека in vivo невозможно, в качестве косвенного показателя оценивают маркеры апоптоза на лимфоцитах периферической крови у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями [18]. На наш взгляд, оценка системы энергопродукции в лимфоцитах

периферической крови наиболее информативна, т. к. их количество в циркулирующей крови наиболее значительно, а функции обеспечиваются высоким энергетическим потенциалом.

Патологическая активация, или ингибирование апоптоза может обернуться реальной угрозой выживанию клеток и привести к нарушениям, в т. ч. функционирования сердечно-сосудистой системы [4]. При инфаркте миокарда (ИМ) кардиомиоциты погибают под воздействием разнообразных факторов: окислительного стресса, ишемии, гипоксии, нарушения метаболизма, ацидоза, механического перерастяжения и др. В результате восстановления кровотока в инфаркт-зависимой артерии происходит реперфузионное повреждение кардиомиоцитов, что, в свою очередь, также протекает с активацией апоптоза [10, 16, 19]. Гибель клеток при апоптозе детерминируется рядом факторов, индукторов и триггеров этого процесса, а также регуляторными внутриклеточными механизмами.

Прогностическая значимость различных лабораторных маркеров апоптоза

На сегодняшний день известны многочисленные маркеры апоптотического процесса. Несомненный интерес представляет сравнительный анализ их прогностического значения. Ряд авторов показали прогностическую значимость маркеров апоптоза для рецидивов стенокардии, прогрессирования сердечной недостаточности [12, 14]. Образование очагов некроза в зоне инфаркта приводит к развитию воспаления, при котором в больших количествах синтезируются провоспалительные цитокины, способные запустить механизм апоптоза.

к сведению

В последнее время появились исследования, показывающие, что молекулы ангиотензина II, соединяясь с рецепторным аппаратом кардиомиоцитов, способны активировать гены апоптоза этих клеток. Аналогичным образом апоптоз протекает в сердце на поздних стадиях прогрессирования хронической сердечной недостаточности (ХСН) [13].

При ХСН изменяется структура митохондрий и уменьшается их количество [20]. В связи с этим снижается ак-

тивность комплексов дыхательной цепи и АТФ-синтетазы, а также скорость окислительного фосфорилирования. Эти изменения приводят к уменьшению потребления кислорода и выработки АТФ, ухудшению утилизации АТФ в клеточном сокращении и релаксации, нарушению митохондриального и цитозольного редокс-статуса (НАДН/НАД) [20].

Однако факторы инициации механизмов апоптоза и пути их реализации в конкретных клинических ситуациях остаются недостаточно изученными. Также не полностью определена прогностическая значимость различных лабораторных маркеров апоптоза, не установлены показания для оценки апоптоза у кардиологических пациентов, нет унифицированных лабораторных методов для использования в КДЛ.

В зависимости от патогенеза заболевания и механизма действия лекарственного препарата необходимо выбирать адекватный метод лабораторной оценки апоптоза. Например, для коррекции энергетических нарушений миокарда при сердечной недостаточности могут применяться препараты коэнзима Q10. Учитывая, что в настоящее время в КДЛ нет метода для оценки функциональной активности митохондрий, предложено использовать метод проточной цитометрии для определения активности мембранного потенциала митохондрий и проницаемости клеточной мембраны мононуклеарных лейкоцитов [2, 9].

Определение различных механизмов индукции апоптоза

В настоящей работе проведено определение различных механизмов индукции апоптоза с использованием разных маркеров. Митохондриальный механизм апоптоза определяли по активности мембранного потенциала митохондрий ($\Delta\Psi m$) у пациентов с ХСН, получавших убидекаренон [8]. Рецепторный механизм апоптоза определяли по количеству CD95+ лимфоцитов у пациентов с ИМ, получавших стандартную терапию и дополнительно омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) [1, 3].

Чтобы оценить функциональное состояние митохондрий у пациентов с сердечной недостаточностью под влиянием препарата коэнзима Q10, в исследование включили 10 больных ХСН после перенесенного ИМ. Средний возраст пациентов –

69,8 ± 5,43 лет, мужчин и женщин поровну. Диагноз ХСН основывался на критериях Общества специалистов по сердечной недостаточности. Все пациенты получали оптимально подобранную стандартную терапию и дополнительно коэнзим Q10 в дозе 120 мг/сут в течение 3 месяцев. Функциональное состояние митохондрий анализировали, определяя мембранный потенциал митохондрий и проницаемость клеточной мембраны мононуклеарных лейкоцитов периферической крови при помощи проточной цитометрии.

Метод проточной цитометрии основан на использовании катионных липофильных красителей йодида 3,3'-дигексилоксакарбоцианина (DiOC6(3) и йодистого пропидия (PI), которые в литературе получили название «митохондриальных зондов», т. к. применяются для изучения мембранного потенциала митохондрий клеток [21]. Благодаря своим липофильным свойствам DiOC6(3) способен свободно проникать через билипидные мембраны клетки (поверхностную мембрану клетки, а также внешнюю и внутреннюю мембраны митохондрий) и благодаря катионным свойствам накапливаться в областях с высокой концентрацией протонов, т. е. в митохондриях. Этот эффект сопровождается изменением интенсивности флуоресценции клеток в зеленой части спектра, что регистрируют на проточном цитофлуориметре [17]. Если концентрация протонов снижена, как это имеет место при нарушении работы дыхательной цепи, краситель будет накапливаться в них менее эффективно и интенсивность флуоресценции будет снижена. Тем самым можно отличить живые клетки с эффективно функционирующими митохондриями (с высокой интенсивностью флюоресценции) от гибнущих или мертвых клеток, в которых функционирование митохондрий нарушено. Такие клетки обладают пониженной интенсивностью флуоресценции.

Исследование показало, что у больных до терапии и после терапии убидекареноном исходно процент DiOC-позитивных клеток повышался с 65,4 ± 4,1% до 72,8 ± 2,8% и после 12-часовой инкубации – с 34,7 ± 3,6% до 52,9 ± 4,8% соответственно. Следовательно, после терапии количество клеток, резистентных к апоптозу, увеличивалось в 1,1 раза при исходном измерении и в 1,5 раза после инкубации у пациентов с сердечной недостаточностью.

При анализе количества клеток, находящихся на ранней стадии апоптоза (DiOC-негативных), до и после терапии вы-

явлено их снижение с 33,5 ± 3,9% до 26,7 ± 2,8% при исходном измерении и с 59,0 ± 3,9% до 43,0 ± 4,4% после инкубации. Следовательно, после терапии убидекареноном процент DiOC-негативных клеток в раннем апоптозе уменьшался в 1,2 раза (исходно) и 1,4 раза (после инкубации).

Увеличение процента DiOC-позитивных клеток может свидетельствовать о сохранении высокой концентрации протонов в митохондриях, что происходит благодаря активной работе ферментативных комплексов дыхательной цепи. Это свидетельствует о повышении функциональной активности митохондрий на фоне терапии, включающей препараты коэнзима Q10. Более высокий процент DiOC-позитивных клеток после 12-часовой инкубации может говорить о повышении устойчивости митохондриальной мембраны.

Определение мембранного потенциала митохондрий мононуклеарных лейкоцитов периферической крови при помощи проточной цитометрии можно использовать в клинико-лабораторной практике для оценки функционального состояния митохондрий и контроля эффективности терапии, влияющей на энергообмен клеток.

Чтобы оценить влияние омега-3 ПНЖК на реализацию рецептор-зависимого пути апоптоза у пациентов с ИМ, в исследование включили 176 пациентов с ИМ. Пациенты наблюдались в течение 1 года, средний возраст 55,5 ± 7,7 лет. Все больные получали стандартную терапию (антиангинальную терапию, β-адреноблокаторы, ингибиторы АПФ, антиагреганты и статины) и дополнительно омега-3 ПНЖК.

Кровь забирали при госпитализации, через 2 недели, 1, 2, 6 и 12 месяцев после ИМ. Основную группу (85 чел.) составили пациенты, которые получали омега-3 ПНЖК в дополнение к стандартной терапии. Пациенты группы сравнения (91 чел.) получали только стандартную терапию. В крови пациентов определяли количество CD95+ лимфоцитов методом проточной цитометрии (FC-500, Beckman Coulter, США) и концентрацию провоспалительного цитокина TNF-α методом ИФА (фотометр Sanofi Diagnostics Pauster, Франция).

В группе пациентов, получавших омега-3 ПНЖК, отмечалось отсутствие динамики степени экспрессии рецепторов CD95 на лимфоцитах в течение времени наблюдения. В группе сравнения через 2 месяца значение данного пока-

зателя было существенно выше (25,3 ± 4,1%, $p < 0,05$), чем в основной группе (15,0 ± 3,6%). В другие сроки после ИМ различий между группами не регистрировали. Можно полагать, что омега-3 ПНЖК оказывали ингибирующее действие на экспрессию рецепторов CD95 на лимфоцитах, которое проявлялось только в первые 2 месяца [1].

Представляется, что высокая степень готовности Т-лимфоцитов к апоптозу, характеризующаяся высокой экспрессией рецепторов CD95 на лимфоцитах через 2 месяца после ИМ, вполне объяснима активными процессами воспаления как в миокарде, так и в области атеросклеротической бляшки, что согласуется с литературными данными [5]. Тогда как препараты, содержащие омега-3 ПНЖК, оказывали ингибирующее действие на экспрессию рецепторов CD95 на лимфоцитах за счет своего мембраностабилизирующего механизма и влияния на рецепторный аппарат клеток (рис. 1).

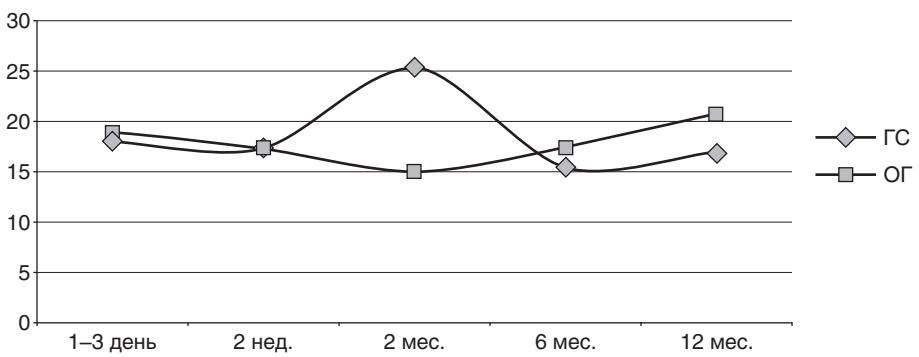


Рис. 1. *Количество рецепторов CD95 на лимфоцитах у пациентов с инфарктом миокарда основной группы (ОГ) и группы сравнения (ГС)*

У пациентов обеих групп через 2 недели после ИМ наблюдалась разнонаправленная тенденция к изменению TNF-α. У пациентов, получавших омега-3 ПНЖК, концентрация TNF-α снижалась с 195,6 ± 30,2 до 178,2 ± 61,1 пг/мл. У пациентов на фоне стандартной терапии концентрация TNF-α повышалась с 201,2 ± 49,3 до 217,9 ± 54,6 пг/мл. Через 2 месяца разница между группами значительно увеличивалась ($p < 0,05$). Концентрация TNF-α у пациентов, получавших стандартную терапию, увеличилась до 332,5 ± 41,9 пг/мл, а при назначении дополнительно омега-3 ПНЖК снизилась до 156,1 ± 35,9 пг/мл. В дальнейшем концентрация TNF-α

снизилась в обеих группах, но оставалась выше границы референтного диапазона (0–50 пг/мл) (рис. 2).

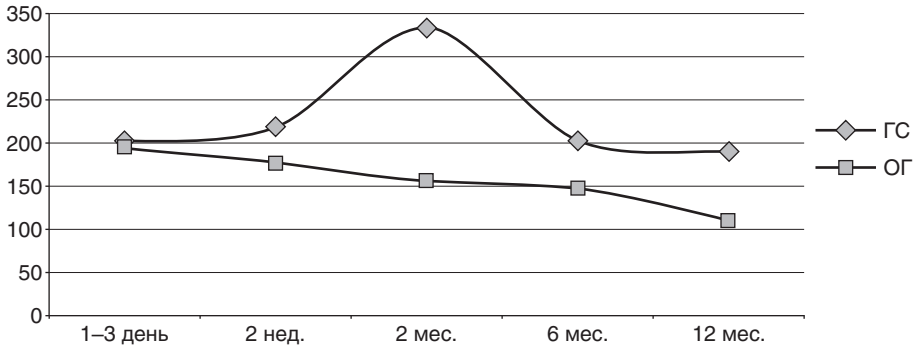


Рис. 2. *Концентрация TNF-α (пг/мл) у пациентов с инфарктом миокарда основной группы (ОГ) и группы сравнения (ГС)*

Важно отметить обнаруженную закономерность изменений количества CD95+ лимфоцитов и содержания TNF-α в крови пациентов с ИМ. Динамика изменений концентрации провоспалительного цитокина соответствовала динамике количества CD95+ лимфоцитов. Через 2 месяца после ИМ концентрация TNF-α и количество CD95+ лимфоцитов были значительно ниже у пациентов, получавших омега-3 ПНЖК, чем у пациентов на стандартной терапии. Вероятно, это обусловлено тем, что рецепторы CD95 и TNF относятся к одному семейству. Омега-3 ПНЖК, встраиваясь в мембрану клетки, изменяют функциональную активность клетки через рецепторный аппарат. Ингибирование апоптоза и стабилизация мембраны снижают восприятие клеткой активирующих факторов и продукцию биологически активных молекул [3].

Таким образом, методом проточной цитометрии возможно изучать влияние различных лекарственных препаратов на механизмы апоптоза при некоторых сердечно-сосудистых заболеваниях, что доступно для выполнения в КДЛ и может использоваться в клинической практике.

Список использованной литературы

1. *Болдуева С.А., Бурбелло А.Т., Гайковая Л.Б и др.* Влияние полиненасыщенных жирных кислот на процессы апоптоза у боль-

ных инфарктом миокарда // Медицинская иммунология. 2004. № 3–5. С. 433.
2. *Войткова В.В.* Изучение апоптоза методом проточной цитофлуориметрии: обзор литературы // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2010. № 6. Ч. 1. С. 220–225.
3. *Гайковая Л.Б., Болдуева С.А., Бурбелло А.Т., Вавилова Т.В.* Определение CD95 в оценке механизмов антиаритмического действия омега-3 полиненасыщенных жирных кислот // Клиническая лабораторная диагностика. 2010. № 10. С. 14–14а.
4. *Голубев А.М. и соавт.* Апоптоз при критических состояниях // Общая реаниматология. 2006. № 5–6. С. 184–190.
5. Иванова М.И., Бурбелло А.Т., Болдуева С.А. Влияние Ω-3 полиненасыщенных жирных кислот на вариабельность сердечного ритма и содержание интерлейкина 6 в крови у больных инфарктом миокарда // Профилактическая и клиническая медицина. 2006. № 2. С. 74–76.
6. *Кудрявцев И.В., Головкин А.С., Зурочка А.В., Хайдуков С.В.* Современные методы и подходы к изучению апоптоза в экспериментальной биологии // Медицинская иммунология. 2012. № 6. С. 461–482.
7. *Левицкая А.Б., Никитюк Д.Б.* Современные методы определения апоптоза // Вестник новых медицинских технологий. 2005. № 3–4. С. 33.
8. *Лобанова О.А., Кухарчик Г.А., Гайковая Л.Б., Ермаков А.И.* Возможности применения проточной цитометрии для оценки функционального состояния митохондрий у больных сердечной недостаточностью // Профилактическая медицина – 2016: материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, 15–16 ноября 2016 года / Под ред. А.В. Мельцера, И.Ш. Якубовой. Ч. 2. СПб: Изд-во СЗГМУ им. И.И. Мечникова, 2016. С. 27–30.
9. *Петрищев Н.Н., Васина Л.В., Луговая А.В.* Содержание растворимых маркеров апоптоза и циркулирующих аннексин V-связанных апоптотических клеток в крови больных острым коронарным синдромом // Вестник Санкт-Петербургского университета. Сер. 11. 2008. Вып. 1. С. 14–23.
10. *Саватеев А.В., Саватеева-Любимова Т.Н.* Апоптоз – универсальный механизм гибели и выживания при ишемии и реперфузии. Пути фармакологического контроля // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2010. № 12. С. 44–49.

11. *Савицкая М.А., Онищенко Г.Е.* Механизмы апоптоза: обзор // Биохимия. 2015. Т. 80. Вып. 11. С. 1613–1627.
12. *Тепляков А.Т. и др.* Ранние маркеры прогрессирования сердечной недостаточности и апоптоза: роль в прогнозировании риска развития неблагоприятных сердечно-сосудистых событий у больных, перенесших инфаркт миокарда // Бюллетень сибирской медицины. 2016. № 1. С. 37–46.
13. *Ушаков А.В., Рассел М.В., Борисов А.Б.* Апоптоз кардиомиоцитов в патогенезе острого инфаркта миокарда и постинфарктного ремоделирования сердца у больных сахарным диабетом // Международный медицинский журнал. 2006. № 1. С. 6–10.
14. *Яковлева А.С., Миролюбова О.А., Супрядкина Т.В.* Сывороточные маркеры апоптоза и классические факторы риска у больных инфарктом миокарда и здоровых жителей Архангельской области: тенденции, причины, последствия // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2013. № 3. С. 18–23.
15. *Abdelwahid E., Rolland S., Teng X. et al.* Mitochondrial involvement in cell death of non-mammalian eukaryotes // Biochim. Biophys. Acta. 2011. Vol. 1813. P. 597–607.
16. *Crow M.T.* The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis // Circ. Res. 2004. Vol. 95. P. 957–970.
17. *Glisic-Milosavljevic S., Waukau J., Jana S. et al.* Comparison of apoptosis and mortality measurements in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) using multiple methods // Cell Prolif. 2005. Vol. 38. P. 301–311.
18. *Pasqui A.L., Di Renso M., Bova G. et al.* Lymphocyte apoptosis in non-ST segment elevation acute myocardial infarction // Ann. Ital. Med. Int. 2003. Vol. 18. P. 154–161.
19. *Saraste A.* Apoptosis in human acute myocardial infarction // Circulation. 1997. Vol. 95. P. 320–323.
20. *Stanley W.C., Recchia F.A., Lopaschuk G.D.* Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart // Physiol. Rev. 2005. Vol. 85. P. 1093–1129.
21. *Stokes L., Jiang L.H., Alcaraz L. et al.* Characterization of a selective and potent antagonist of human P2X(7) receptors, AZ11645373 // Br. J. Pharmacol. 2006. Vol. 149. P. 880–887.

Применение метода проточной цитометрии для диагностики аллергических заболеваний

Н.В. Бычкова

канд. биол. наук, ст. науч. сотр.
лаборатории клинической иммунологии
ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова» МЧС России, г. Санкт-Петербург

В статье обсуждаются теоретические аспекты и области клинического применения исследования активации базофилов методом проточной цитометрии. Сопоставлены свойства различных наборов для данного теста. Обсуждены методические особенности забора крови для исследования, проведения анализа и возможности использования различных аллергенов. Приведены данные о чувствительности и специфичности теста активации базофилов в оценке сенсибилизации к различным аллергенам. Представлены собственные данные по диагностике пищевой и лекарственной аллергии у пациентов детского возраста.

Комплексная диагностика аллергических заболеваний основывается преимущественно на описании клинической картины и тщательно собранном аллергологическом анамнезе, а также тестах in vivo.

Лабораторная диагностика используется в анамнестически сложных случаях, при сомнительных результатах кожных проб или имеющихся противопоказаниях к их применению и сопряжена с рядом трудностей, связанных с многообразием патогенетических механизмов аллергической реакции. Большинство современных лабораторных методов направлено на диагностику заболеваний, обусловленных реакциями гиперчувствительности немедленного типа (реакции первого типа), что имеет высокое клиническое значение из-за возможных тяжелых проявлений этих болезней. Аллергические реакции первого типа обусловлены IgE-опосредованным выделением медиаторов из сенсибилизированных базофилов и тучных клеток при контакте с аллергеном и наблюдаются при

анафилаксии, аллергическом рините, крапивнице, бронхиальной астме, атопическом дерматите и др.

Преимуществами лабораторной диагностики аллергии являются объективность оценки результата тестов, возможность выявления сенсибилизации одномоментно к значительному количеству аллергенов, в т. ч. различным классам лекарственных препаратов, отсутствие противопоказаний для обследования и необходимости отмены антигистаминных препаратов, отсутствие тяжелых патологических реакций во время обследования.

К недостаткам лабораторной аллергодиагностики следует отнести вероятность получения ложноотрицательных результатов, особенно в период ремиссии, а также ложноположительных результатов вследствие наличия латентной сенсибилизации. Для лабораторной диагностики аллергии необходимо использование высокотехнологичного оборудования, что подразумевает высокую стоимость обследования и зачастую более длительное – по сравнению с проведением кожного тестирования – время получения результата.

При использовании количественных методов лабораторной диагностики аллергии (определение общего и специфических IgE, IgG4) возможна диагностика сенсибилизации и непереносимости, в основном к пищевым и ингаляционным аллергенам, некоторым лекарственным веществам. Потенциал лабораторной диагностики значительно увеличивается при использовании функциональных клеточных тестов.

Ранее применялись следующие методы для выявления аллергии с использованием функциональных клеточных тестов – микроскопия для оценки дегрануляции базофилов при окрашивании щелочными красителями и определение концентрации освобожденного гистамина из реактивных базофилов после стимуляции.

В настоящее время лидирующие позиции в диагностике аллергии с помощью функциональных клеточных тестов занимает тест активации базофилов, предложенный в 1990-х гг., – определение количества активированных базофилов после стимуляции in vitro (в качестве стимулов могут быть использованы пищевые, ингаляционные, инсектные, значительный спектр лекарственных аллергенов и др.). Этот тест является аналогом провокационного теста in vivo и дает возможность ремоделирования in vitro контакта предполагаемого аллергена с базофилами периферической крови пациента. Тест активации базофилов выявляет связанные с мембраной тучных клеток и базофилов IgE.

Основанием для разработки теста активации базофилов послужила способность этих клеток дегранулировать после перекрестного связывания специфического IgE с высокоаффинным рецептором FcεRI при контакте с аллергеном, что приводит к синтезу и секреции лейкотриенов, цитокинов, медиаторов воспаления, вызывающих симптомы аллергии.

Плотность комплекса FcεRI-IgE на мембране базофилов и тучных клеток зависит от концентрации IgE в периферической крови [18].

Основными областями применения теста активации базофилов являются:

- выявление аллергенов различной природы для диагностики и подтверждения IgE-зависимой аллергии и псевдоаллергических реакций в случаях невозможности проведения, противоречивых или отрицательных результатов кожных тестов и анализа специфических IgE [8];
- оценка эффективности проводимой аллерген-специфической иммунотерапии [17] и лечения анти-IgE-препаратами [11];
- определение возможности повторного введения продукта после окончания элиминационной терапии [15].

В настоящее время различные производители представляют наборы для выявления активации базофилов методом проточной цитометрии – Flow-CAST (Bühlmann laboratory, Швейцария), BASOTEST (Beckton Dickinson, Нидерланды), Allergenicity kit (Beckman Coulter, Англия), которые различаются по специфическим маркерам как для выявления базофилов, так и для оценки их активации (табл. 1).

Таблица 1

Наборы для оценки активации базофилов методом проточной цитометрии

Клетки/маркеры	Flow-CAST	BASOTEST	Allergenicity kit
Выделение лейкоцитов	Рекомендовано	Не требуется	Не требуется
Маркеры для идентификации базофилов	Рецептор для IgE (FcεRI)	Рецептор для IgE (FcεRI)	CD3-CRTH2+ CD203c+
Маркер для выявления активации базофилов	CD63+	CD63+	CD203c+++
Типы клеток, на которых представлены маркеры активации	Базофилы, тучные клетки, тромбоциты, макрофаги		Базофилы

Преимуществами исследования активации базофилов методом проточной цитометрии являются:

- использование небольшого количества образца (50–100 мкл цельной крови);
- исследование маркеров активации на уровне одной клетки (каждой клетки);
- получение результата в относительно короткие сроки (1,5–2 ч);
- идентификация базофилов без их выделения из цельной крови.

Условия инкубации базофилов с аллергенами in vitro с использованием цельной крови в большей степени соответствуют процессам in vivo (при-

сутствие IgE-антител, антител к рецепторам IgE, циркулирующих иммунных комплексов, компонентов комплемента и лекарственных средств).

Наилучшими комбинациями маркеров для выявления базофилов признаны маркеры CD3-/CRTH2+ и CD123+/HLA DR- [8]. Клиническая значимость использования для оценки активации базофилов CD63 и CD203c признана сопоставимой [9], но выявленные особенности экспрессии этих маркеров должны учитываться как при взятии, хранении и подготовке образцов крови, так и при оценке позитивности теста.

Аллергены для выполнения теста активации базофилов не входят в состав наборов реагентов. Существует мнение [4], что желательно использовать стандартизованные аллергены, адаптированные для клеточных тестов. Некоторые исследователи применяют аллергены для кожных проб [10], готовят экстракты самостоятельно [20] и используют готовые лекарственные препараты. Необходимые характеристики аллергенов для теста активации базофилов – отсутствие цитотоксичности (добавки, консерванты), неспецифической активации (эндотоксины, лектины) и способность вызывать специфическую активацию клеток. Белковые аллергены используют в диапазоне концентраций мкг/мл – пкг/мл, для чего их разводят в 50–150 раз. Лекарственные аллергены активны в концентрациях мг/мл, их разводят 5–25-кратно [8].

Периферическую кровь для исследования в тесте активации базофилов преимущественно забирают в вакутейнеры с гепарином, т. к. для проведения всех функциональных тестов необходимо присутствие в образце ионов кальция. Многие наборы реагентов содержат специальный буферный раствор, которым можно восполнить недостаток ионов кальция в случае использования в качестве антикоагулянтов ЭДТА либо цитрата натрия.

Алгоритм проведения теста активации базофилов in vitro – исследование спонтанной активации базофилов с буферным раствором (негативный контроль), исследование индуцированной активации базофилов, стимулированной IgE-антителами (позитивный контроль, входит в состав набора реагентов), и исследование индуцированной активации базофилов, стимулированной различными аллергенами (тестовая проба).

Активация базофилов – процесс, требующий соблюдения ряда условий. Инкубация образцов цельной крови с потенциальными аллергенами в присутствии моноклональных антител для идентификации и оценки активации базофилов проводится при оптимальной температуре 37 °C в течение 15 мин в темноте при наличии ионов кальция [6]. В дальнейшем эритроциты лизируют, лейкоциты фиксируют реагентами, входящими в набор. После отмывки буфером и ресуспендирования пробы готовы для исследования методом проточной цитометрии. В протоколе исследования в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя набора проводят оценку 500 базофилов.

Для корректной оценки спонтанной активации базофилов необходимо знать особенности экспрессии используемого в наборе реагентов маркера активации. Базальный уровень активации базофилов практически всегда ниже 2% – принцип «все или ничего» [3], если в набор входят моноклональные антитела к CD63.

При использовании маркера CD203c базальный уровень активации базофилов может быть значительно выше в случае массивного поступления аллергена, например в разгар цветения при полинозе [4], обострении астмы [12], при методических погрешностях, длительном промежутке времени (более 2–3 ч) между взятием образца крови и постановкой теста.

Желательно выполнять исследование активации базофилов не позже чем через 3 ч после взятия крови (в идеале – в течение одного часа). Помимо увеличения базового уровня CD203c++ базофилов в процессе пребывания крови в вакутейнере, что может затруднить интерпретацию данных, Sturm G.J. с соавторами [19] наблюдали снижение специфической активации в тесте с аллергеном при длительном (до суток) хранении пробы.

Антигистаминные препараты не влияют на оценку результатов тестов активации базофилов, но прием стероидов может снизить чувствительность метода [19].

Для индукции неспецифической активации базофилов используют поликлональные IgE-антитела, этот реагент входит в состав набора. Для того чтобы возможно было оценить специфическую активацию базофилов в тестах с аллергенами, необходимо при исследовании положительного контрольного образца зарегистрировать превышение количества активированных базофилов не менее чем на 10% [7] по сравнению с бланком (проба с буферным раствором). Пациенты, базофилы которых не отвечают активацией на IgE-антитела, в литературе обозначаются как нонреспондеры. Для таких пациентов невозможна корректная интерпретация отрицательных результатов в тесте с аллергеном [6]. Количество нонреспондеров в популяции находится на уровне 2,5–17% [6, 8]. Причинами вариабельности вплоть до полного отсутствия активации базофилов в присутствии аллергенов могут быть как проведение исследования в рефрактерный период, так и индивидуальные особенности нарушения проведения сигнала от комплекса FcεRI-IgE с участием тирозинкиназы Syk [13].

На данный момент тест активации базофилов находится в процессе стандартизации, нет установленных правил оценки позитивности теста. Существуют два главных подхода к изучению активации базофилов – оценка реактивности базофилов по увеличению их количества в сравнении с базовым уровнем [15] и оценка чувствительности базофилов на основании определения концентрации аллергена, при которой половина всех проанализированных базофилов становятся активированными [11]. Последний подход наиболее востребован при оценке эффективности аллерген-специ-

фической иммунотерапии. Порог позитивности, определяемый по индексу стимуляции, при оценке реактивности базофилов также отличается у разных исследователей. Индекс стимуляции – отношение количества активированных базофилов в пробе с аллергеном к количеству активированных базофилов в пробе с буферным раствором. Тест с аллергеном разными авторами рассматривается в качестве позитивного при различных индексах стимуляции, например более 2 [2], более 1,73 [7], более 1,06 [1].

Тест активации базофилов показывает высокую специфичность и чувствительность при изучении сенсибилизации к различному спектру аллергенов – пищевых, ингаляционных, лекарственных (табл. 2).

В нашем исследовании тест активации базофилов проводили с использованием набора Allergenicity kit (Beckman Coulter) в группе из 350 детей с атопическим дерматитом. Возраст детей на момент обследования составил 3,5 ± 2 года, тяжелое течение наблюдалось у 110 пациентов, течение средней тяжести – у 240 детей. Спонтанная активация базофилов составила 18,2 ± 3,4% по сравнению с 4,7 ± 1,5% ($p < 0,05$) у условно здоровых детей (12 детей, по возрасту и полу не отличавшихся от пациентов с атопическим дерматитом). Следует отметить, что спонтанная активация базофилов была значительно выше у детей с обострением заболевания по сравнению с пациентами в состоянии ремиссии (29,1 ± 4,1% и 8,2 ± 2,3% соответственно, $p < 0,05$).

Таблица 2

Специфичность и чувствительность теста активации базофилов

Вид аллергена	Специфичность	Чувствительность	Автор
Белок молока	90	91	[15]
Белок пшеницы	77,2	85	[20]
Рентгеноконтрастные вещества	100	62,5	[16]
β-лактамные антибиотики	80	55	[5]
Пыльца луговых трав	100	92,3	[14]

Активация базофилов поликлональными IgE-антителами у условно здоровых детей (позитивный контроль) была выше, чем у пациентов с атопическим дерматитом (79,1 ± 8,4% против 29,1 ± 4,1%, $p < 0,05$).

Индекс активации базофилов у сенсибилизированных пациентов был выше при оценке ингаляционных аллергенов по сравнению с пищевыми (рисунок, $p < 0,05$ по сравнению с условно здоровыми лицами).

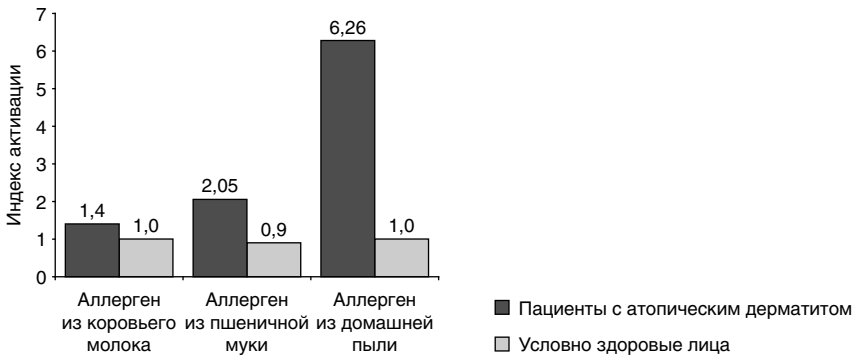
Чувствительность выявления сенсибилизации к белкам коровьего молока с использованием теста активации базофилов в нашем исследовании составила 83%.

Выявление активации базофилов in vitro на пищевые аллергены даже при отсутствии специфических IgE должно учитываться врачом-аллерго-

логом при составлении диеты. Элиминация аллергена из рациона приводит к купированию кожных и респираторных симптомов аллергии.

При повторном исследовании на фоне адекватной диетотерапии, по нашим данным, приблизительно у 60–80% пациентов активация базофилов на аллергены исключенных продуктов не выявляется. Самое значимое снижение частоты выявления сенсибилизации при применении диетотерапии мы наблюдали на аллергены говядины, рисовой и гречневой круп, картофеля, коровьего молока. Вероятно, сохранение значительного количества пациентов, прошедших диетотерапию, но демонстрирующих сенсибилизацию к аллергенам пшеничной и ржаной муки, связано с невозможностью полностью исключить эти продукты из рациона ребенка.

Индекс активации базофилов на различные аллергены



С целью изучения возможности применения теста активации базофилов (Allergenicity kit, Beckman Coulter) для установления аллергии на йодсодержащие рентгеноконтрастные препараты исследовали периферическую кровь у девяти условно здоровых лиц без проявлений аллергических реакций и 49 пациентов с аллергической реакцией на йод в анамнезе (35 чел. с кожными проявлениями, 14 чел. с системными). Реакция in vitro на какой-либо исследуемый препарат (ультравист, омнипак, оптирей) была выявлена у 16 из 49 обследованных (33%).

В ходе проведенного исследования не было выявлено превалирования частоты встречаемости сенсибилизации in vitro ни к одному из тестированных препаратов. Ретроспективное исследование показало отсутствие аллергических реакций на введение рекомендованных рентгеноконтрастных препаратов у всех обследованных пациентов.

Тест активации базофилов рекомендуется проводить у пациентов с отягощенным аллергологическим анамнезом для выявления сенсибилизации к йодсодержащим рентгеноконтрастным препаратам непосредственно перед их применением.

Тест активации базофилов in vitro методом проточной цитометрии – доступный и перспективный метод исследования гиперчувствительности немедленного типа. Он может быть рекомендован для использования в комплексной диагностике пищевой и бытовой аллергии, а также в качестве теста выбора для установления лекарственной аллергии у пациентов с отягощенным анамнезом. При современном уровне оснащения большинства иммунологических лабораторий специалистам следует обратить внимание на высокие диагностические возможности теста активации базофилов с целью введения его в широкую клиническую практику.

Список литературы

1. *Abuaf N., Rostane H., Barbara J., Toly-Ndour C., Gaouar H., Mathelier F., Frances C., Girot R.* Comparison of CD63 upregulation induced by NSAID hypersensitivity // J. of Allergy. 2012. Vol. 58. P. 873–879.

2. *Aranda A., Mayorga C., Ariza A., Dona I., Blanca-Lopez N., Canto G., Blanca M., Torres M.J.* IgE-mediated hypersensitivity reactions to methylprednisolon // Allergy. 2010. Vol. 65. P. 1376–1380.

3. *De Weck A.L., Sanz M.L.* For allergy diagnostic flow cytometry, detection of CD203c instead of CD63 is not at all an improvement in other hands (Correspondence) // Clin. Exp. Allergy. 2003. Vol. 33. P. 849–852.

4. *De Weck A.L., Sanz M.L., Gamboa P.M., Aberer W., Bienvenu J., Blanca M., Demoly P., Ebo D.G., Mayorga L., Monneret G., Sainty Laudy J.* Diagnostic tests based on human basophils: more potentials and perspectives than pitfalls. II. Technical issues // J. Investig. Allergol. Clin. Immunol. 2008. Vol. 18 (3). P. 389–400.

5. *Eberlein B., León Suárez I., Darsow U., Ruëff F., Behrendt H., Ring J.* A new basophil activation test using CD63 and CCR3 in allergy to antibiotics // Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol. 2010. Vol. 40. P. 411–418.

6. *Ebo D. G., Bridts C. H., Hagendorens M. M., Aerts N. E., De Clerck L. S., Stevens W. J.* Basophil activation test by flow cytometry: Present and future applications in allergology//Cytometry Part B: Clinical Cytometry. 2008. Vol. 74B (4). P. 201–210.

7. *Hagau N., Gherman-Ionica N., Sfichi M., Petrisor C.* Threshold for basophil activation test positivity in neuromuscular blocking agents hypersensitivity reactions // Allergy, Asthma and ClinicalImmunology. 2013. Vol. 9. P. 42–48.

8. *Hoffmann H.J. , Santos A.F., Mayorga C., Nopp A., Eberlein B., Ferrer M., Rouzaire P., Ebo D., Sabato V., Sanz M.L., Pecaric-Petkovic T., Patil S.U., Hausmann O.V., Shreffler W.G., Korose .P., Knol E.F.* The Clinical Utility of Basophil Activation Testing in Diagnosis and Monitoring of Allergic Disease // Allergy. 2015. Vol. 71. P. 1393–1405.

9. *Mikkelsen S., Bibby D.M., Dolberg M.K.B., Dahl R., Hoffmann H.J.* basophil sensitivity through CD63 or CD203c is a functional measure for specific immunotherapy // Clinical and Molecular Allergy. 2010. Vol. 8. P. 2–10.

10. *Nopp A., Johansson S.G.O., Ankerst J., Bylin G., Cardell L.O., Gronneberg R., Irander K., Palmqvist M., Oman H.* Basophil allergen threshold sensitivity: a useful approach to anti-IgE treatment efficacy evaluation // Allergy. 2006. Vol. 61. P. 298–302.

11. *Nopp A., Cardell L.O., Johansson S.G.O., Oman H.* CD-sens: a biological measure of immunological changes stimulated by ASIT // Allergy. 2009. Vol. 64. P. 811–814.

12. *Ono E., Taniguchi M., Higashi N., Mita H., Kajiwara K., Yamaguchi H., Tatsuno S., Fukutomi Y., Tanimoto H., Sekiya M.K., Oshikata Ch., Tsuburai T., Tsurikisawa N., Otomo M., Maeda Y., Hasegawa M., Miyazaki E., Kumamoto T. and Akiyama K.* CD203c expression on human basophils is associated with asthma exacerbation // J. Allergy Clin. Immunol. 2010. Vol. 125 (2). P. 483–489.

13. *Patil S.U. and Shreffler W. G.* Immunology in the Clinic Review Series; focus on allergies: basophils as biomarkers for assessing immune modulation // Clinical and Experimental Immunology. 2011. Vol. 167. P. 59–66.

14. *Potapińska O., Górska E., Zawadzka-Krajewska A., Kulus M., Wąsik M., Demkow U.* The usefulness of CD203c expression measurement on basophils after activation with grass pollen and Dermatophagoides pteronyssinus antigens. Preliminary study // Pneumonol. Alergol. Pol. 2009. Vol. 77. P. 138–144.

15. *Rubio A., Vivinus-Nebot M., Bourrier T., Saggio B., Albertini M. & Bernard A.* Benefit of the basophil activation test in deciding when to reintroduce cow's milk in allergic children // Allergy. 2011. Vol. 66. P. 92–100.

16. *Salas M., Gomez F., Fernandez T. D., Dona I., Aranda A., Ariza A., Blanca-Lopez N., Mayorga C., Blanca M. & Torres M. J.* Diagnosis of immediate hypersensitivity reactions to radiocontrast media // Allergy. 2013. Vol. 68. P. 1203–1206.

17. *Schmid J.M., Wurtzen P.A., Dahl R., Hoffmann H.J.* Early improvement in basophil sensitivity predicts symptom relief with grass pollen immunotherapy // J. Allergy Clin. Immunol. 2014. Vol. 134. P.741–744. e5.

18. *Sihra B.S., Kon A.M., Grant J.A., Kay A.B.* Expression of high affinity IgE receptors (FceRI) on peripheral blood basophils, monocytes, and eosinophils in atopic and nonatopic subjects: relationship to total serum IgE concentration // J. Allergy Clin. Immunol. 1997. Vol. 99. P. 699–706.

19. *Sturm G.J., Kranzelbinder B., Sturm E.M., Heinemann A., Groselj-Strele A., Aberer W.* The basophil activation test in the diagnosis of allergy: technical issues and critical factors // Allergy. 2009. Vol. 64. P. 1319–1326.

20. *Tokuda R., Nagao M., Hiraguchi Y., Hosoki K., Matsuda T., Kouno K., Morita E. and Fujisawa T.* Antigen-induced expression of CD203c on basophils predicts IgE-mediated wheat allergy // Allergology International. 2009. Vol. 58. P. 193–199.

Возможности метода проточной цитометрии в диагностике нарушений иммунной системы

Н.В. Пронкина

канд. биол. наук, заведующая лабораторией клинической иммунологии,

И.В. Шишкова

врач клинической лабораторной диагностики лаборатории клинической иммунологии,

Е.В. Труфакина

врач клинической лабораторной диагностики лаборатории клинической иммунологии

Клиника иммунопатологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» («НИИФКИ»), г. Новосибирск

За последние годы метод проточной цитометрии становится одним из основных подходов для диагностики в клинико-иммунологической практике. Расширилась база как приборов, так и реагентов, что значительно увеличило возможности анализа клеток иммунной системы. Современная цитометрия позволяет охарактеризовать не только качественные и количественные параметры основных популяций клеток, но и их более тонкий субпопуляционный состав. Значительно расширились возможности диагностики иммунодисфункций, аллергодиагностики, выявления аутоиммунных клонов клеток, специфических Т-эффекторов и др.

Появление метода проточной цитометрии дало импульс развитию многих сфер медицины и биологии. Каждый год расширяются возмож-

ности этого метода, и на сегодняшний день проточная цитометрия – «золотой стандарт» в клинической иммунологии и онкогематологии. Метод занял прочные позиции в различных областях медицины – как клинических: иммунология, онкология, в т. ч. онкогематология (включая диагностику, оценку эффективности лечения, мониторинг пациентов группы риска), трансплантология, общая гематология, клеточная физиология, генетика и др.; так и исследовательских: изучение кинетики различных популяций клеток, свойств внутриклеточных ферментов, механизмов действия различных иммуномодуляторов и других биологически активных веществ. Постоянно увеличиваются возможности анализа различных параметров клеток, их морфологии и клеточного цикла. Этому способствуют модификация и совершенствование лабораторной аппаратуры, расширение базы реагентов. На последнем рабочем совещании группы HLAD (Humen Leukocyte Differentiation Antigens) было принято 364 «кластера дифференцировки», тогда как 30 лет назад их было всего 15.

Принцип проточной цитометрии состоит в оптическом анализе клеток или их частей в гидродинамически узконаправленном потоке, который пересекает сфокусированный лазерный пучок. Через проточную ячейку под определенным давлением движется постоянный ток изотонического раствора, «обжимающая» жидкость. Через зонд, который находится внутри проточной ячейки, подается исследуемый образец, содержащий клетки, обработанные моноклональными антителами, конъюгированными с флуоресцентными красителями. За счет разницы давлений в зонде и «обжимающей» жидкости происходит гидродинамическое фокусирование струи в струе. Клетки выстраиваются друг за другом и в определенном месте пересекают лазерный пучок, где и происходит измерение параметров клетки. Оптические сигналы фиксируются системой фотоумножителей и зеркал. В момент пересечения клеткой лазерного луча детекторы фиксируют:

- рассеяние света под малыми углами (от 1° до 10°) (данная характеристика используется для определения размеров клеток);
- рассеяние света под углом 90° (позволяет судить о соотношении ядро/цитоплазма, а также о неоднородности и гранулярности клеток);
- интенсивность флуоресцентных сигналов (возможно – нескольких флуоресцентных красителей);
- поляризацию флуоресценции и время пролета частицы. Эти показатели позволяют оценить степень вязкости мембран клеток, которая меняется в зависимости от их функционального состояния, и степень асимметричности клеток или исследуемых органелл.

Современные технические характеристики проточных цитометров обеспечивают методу проточной цитометрии ряд преимуществ перед

другими методами флуоресцентных измерений. Это высокая скорость анализа, анализ большого количества клеток (до $1x10^6$ клеток в образце), измерение параметров малых субпопуляций и редко встречающихся частиц, возможность в одном образце проанализировать несколько субпопуляций клеток [2].

Основной задачей проточной цитометрии в иммунологии является иммунофенотипирование нормальных и патологических иммунокомпетентных клеток. Для ее решения проточная цитометрия обладает практически неограниченными возможностями иммунофенотипирования лимфоцитов.

Возможности проточной цитометрии:

- определение количества как основных популяций, так и малых субпопуляций по фенотипическим и функциональным признакам, в т. ч. по внутриклеточной продукции специфических цитокинов, характерных для определенного типа лимфоцитов (как в случае с Т-хелперами 1-го и 2-го типа);
- анализ функциональной активности процессов клеточной активации;
- определение маркеров пролиферативной активности клеток иммунной системы (Ki-67, PCNA, Cyclin D3);
- анализ клеточного цикла с определением распределения клеточной популяции по фазам цикла (ДНК-цитометрия);
- детекция и мониторирование минимальной резидуальной болезни;
- анализ маркеров апоптоза (аннексина V, CD95 Fas/APO-1, CD95L, Bcl-2, P53);
- исследование фагоцитоза, поглотительной способности фагоцитов, бактерицидной и фунгицидной функции фагоцитов;
- исследование продукции активных форм кислорода.

Диагностика нарушений иммунной системы

В одной статье трудно полностью осветить все имеющиеся возможности метода, поэтому остановимся подробнее на основных разделах, которые касаются клинического применения проточной цитометрии и входят уже в достаточно четкие стандарты исследования параметров иммунного статуса, а также рассмотрим использование проточной цитометрии в диагностике нарушений иммунной системы.

Одной из задач клинической иммунологии является оценка иммунного статуса пациента. Минимальный объем иммунологических исследований включает определение общих Т-лимфоцитов, Т-хелперов, Т-цитотоксических лимфоцитов, натуральных (естественных) киллеров. Наиболее важными поверхностными маркерами популяции лимфоцитов являются: для определения зрелых Т-лимфоцитов – CD3,

Т-хелперов/индукторов – CD4, Т-цитотоксических лимфоцитов – CD8; В-лимфоцитов – CD19, CD20 и CD22; натуральных киллеров – CD16, CD56 и CD57. В первую очередь определение количества Т-хелперов незаменимо при дифференцировке и дальнейшем мониторировании ВИЧ-инфекции (рис. 1). Современные цитометры позволяют расширить этот минимальный объем исследований за счет дифференцировки малых субпопуляций лимфоцитов и пулов активированных клеток, что дает дополнительные прогностические факторы особенностей течения заболевания и его исхода [1].

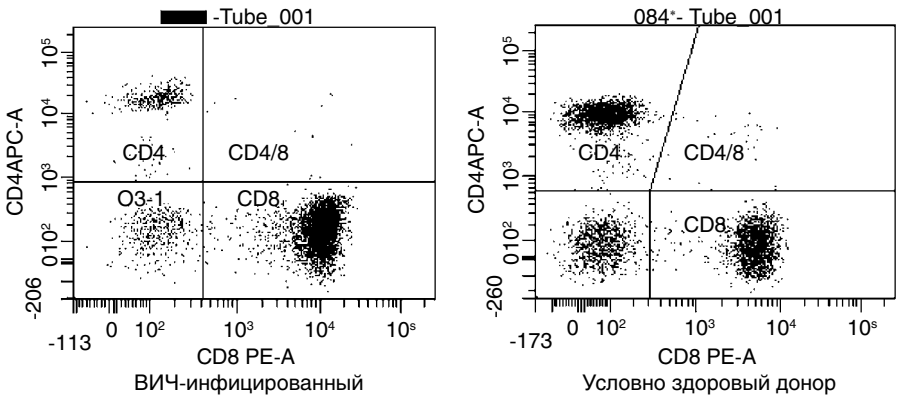


Рис. 1. *Пример инверсии регуляторного индекса*

Оценка функциональной активности лимфоцитов имеет важное значение, т. к. часто при многих заболеваниях и вторичных иммунодефицитах наблюдается нормальное количественное содержание этих клеток, но их функции зачастую угнетены или увеличены в значительной степени, что может являться определяющим звеном в патогенезе того или иного заболевания. Наиболее часто используют следующие маркеры активации: CD25 (рецептор интерлейкина-2), CD38, CD69, анти-HLA-DR [6, 8]. Важно, что с помощью цитометрии можно исследовать как поверхностные, так и внутриклеточные маркеры и сигнальные молекулы. Появление молекул CD69 считают основным фенотипическим признаком ранней (первые часы) стадии активации наивных Т-лимфоцитов. Экспрессия молекул CD25 на поверхности Т-лимфоцитов рассматривается как специфический признак пролиферативной активности Т-клеток. Популяция Т-клеток, экспрессирующая CD25, гетерогенна по функциональным свойствам. Регуляторные Т-лимфоциты являются супрессорными клетками. Они регулируют Т-клеточный гомеостаз, предотвращают аутоиммунные заболевания, аллергии, гиперчувствительность, реакцию трансплантат против хозяина, в то же время снижают противоопухолевый иммунитет и иммунитет к инфекциям. HLA-DR принадлежит к молекулам главного

комплекса тканевой совместимости класса II. Эта молекула представляет антиген Т-клеткам. У здоровых людей моноциты несут на своей поверхности высокое количество молекул HLA-DR, и эту экспрессию легко увидеть с помощью проточной цитометрии. Если плотность экспрессии молекул HLA-DR снижена, то это сопряжено с риском инфекционных и других осложнений для пациентов после хирургических вмешательств, травм, ожогов [5].

Широкие потенциальные возможности проточной цитометрии привели к разработке способов оценки функционального состояния иммунокомпетентных клеток. Современные стандартизированные наборы реагентов для проточной цитометрии позволяют оценить фагоцитарную и бактерицидную активность нейтрофилов. Изменение фагоцитарной активности нейтрофилов сопровождается формированием разнообразных клинических симптомов. Данный эффект может быть связан как непосредственно с дефектом нейтрофилов, так и с дефектами системы комплемента. Изменение фагоцитарной активности встречается при травмах, диабете, почечной недостаточности, заболеваниях печени и инфекциях. Для оценки завершенности фагоцитоза можно провести анализ «кислородного взрыва». Поглощенные микроорганизмы уничтожаются за счет как зависимых, так и независимых от участия кислорода механизмов. Свободные радикалы кислорода убивают поглощенные бактерии в фагосомах, при этом повреждают окружающие ткани. Этот процесс получил название «окислительного» или «кислородного взрыва». Отсутствие или слабый «кислородный взрыв» наблюдается при врожденной патологии – хроническом гранулематозе. Нейтрофилы у пациентов с этой патологией не могут произвести значительный «кислородный взрыв» из-за врожденных дефектов структуры основных пептидов NADPH-оксидазы. Уровень «кислородного взрыва» снижается у пациентов со СПИДом и после трансплантации кроветворных периферических стволовых клеток [1, 5]. Процесс измерения фагоцитарной активности и «кислородного взрыва» методом проточной цитометрии более трудоемок, чем простое иммунофенотипирование лимфоцитов, но высокая производительность и иммунофенотипический выбор исследуемой популяции делают результаты этого метода измерения более достоверными по сравнению с микроскопией.

Вызывают интерес возможности цитометрии в области аллергологии, а именно анализ функциональной активности базофилов как основных участников процесса развития аллергических реакций. Исследования стали возможными в результате открытия ряда фенотипических маркеров и получения моноклональных антител к ним. На сегодняшний день для идентификации базофилов используют такие маркеры, как CD123, CD203c, CRTH2 – хемоаттрактант-подобный рецептор и CD63 [9]. Изменения экспрессии этих маркеров высокоспецифичны и чувствительны,

коррелируют с уровнем аллерген-специфических IgE-антител в крови, что важно для диагностики аллергических состояний in vitro. Основной целью постановки функциональных тестов in vitro является воспроизведение механизма контакта аллергена с клетками, которые отвечают за развитие аллергического воспаления. Этот метод диагностики имеет большое значение в случаях получения противоречивых результатов при проведении кожных проб и исследовании аллерген-специфического IgE в крови. Данный тест активно применяют для контроля аллерген-специфической иммунотерапии.

Для диагностики ревматологических заболеваний методом проточной цитометрии можно проанализировать экспрессию антигена HLA-B27, который является молекулой главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) класса I. Молекулы ГКГС класса I представляют собой гликопротеины, которые располагаются на клеточной поверхности и экспрессируются большинством ядросодержащих клеток человека и тромбоцитами. Присутствие антигена HLA-B27 в высокой степени ассоциировано с анкилозирующим спондилоартритом, хроническим воспалением осевой части опорно-двигательной системы и другими ревматологическими заболеваниями (синдром Рейтера, острый передний увеит и воспалительные заболевания пищеварительного тракта) [7]. Определение HLA-B27 обычно проводится для диагностики анкилозирующего спондилоартрита, т. к. поверхностный антиген HLA-B27 присутствует у 90% пациентов с данным заболеванием и только у 8% здоровых людей.

Важное применение проточной цитометрии в клинической практике – возможность оценки иммунологического фенотипа нормальных и опухолевых клеток в онкогематологии с целью диагностики и прогноза заболеваний, а также мониторирования острых лейкозов и лимфопролиферативных заболеваний в процессе лечения, подсчета абсолютного количества стволовых гемопоэтических клеток, используемых для последующей трансплантации. Значение применения проточной цитометрии в этой области медицины можно оценить по количеству статей, посвященных данной тематике, и многочисленным конференциям по вопросам стандартизации и улучшения диагностических панелей моноклональных антител для поиска специфических маркеров заболевания и прогноза его течения. Большой вклад в вопрос стандартизации метода проточной цитометрии вносит Европейский консорциум EUROFLOW [4].

В настоящее время ведется поиск прогностических факторов, связанных с моноклональными антителами, в области онкогематологии и онкологии. Патологическое появление или исчезновение рецептора на клетке или патологическое распределение его плотности на мембране может служить маркером определения тактики дальнейшей терапии [11]. Проточная цитометрия внесла большой вклад в диагностику гемобластозов,

данный метод позволяет установить линейность и стадию созревания патологических клеток, что необходимо для постановки диагноза. На рис. 2 приведен пример диагностики редкого заболевания – синдрома Сезари. Грибовидный микоз (синдром Сезари) составляет 2–3% всех злокачественных лимфом. Заболевание развивается медленно, характерно поражение кожи в виде папул, эритемы, эритродермии, которые сопровождаются зудом [2]. Диагностика затруднена, такие пациенты долгие годы находятся на лечении у аллергологов, и только биопсия тканей кожи может показать скопление патологических лимфоцитов. Проточная цитометрия уже при лейкемизации периферической крови или аспирата костного мозга позволяет поставить диагноз тяжелого злокачественного заболевания [3, 10]. Метод проточной цитометрии не заменяет морфологические, иммуногистохимические и молекулярные методы диагностики лейкозов и лимфом, но наряду с перечисленными методами должен войти в «золотой стандарт» диагностики онкогематологических заболеваний.

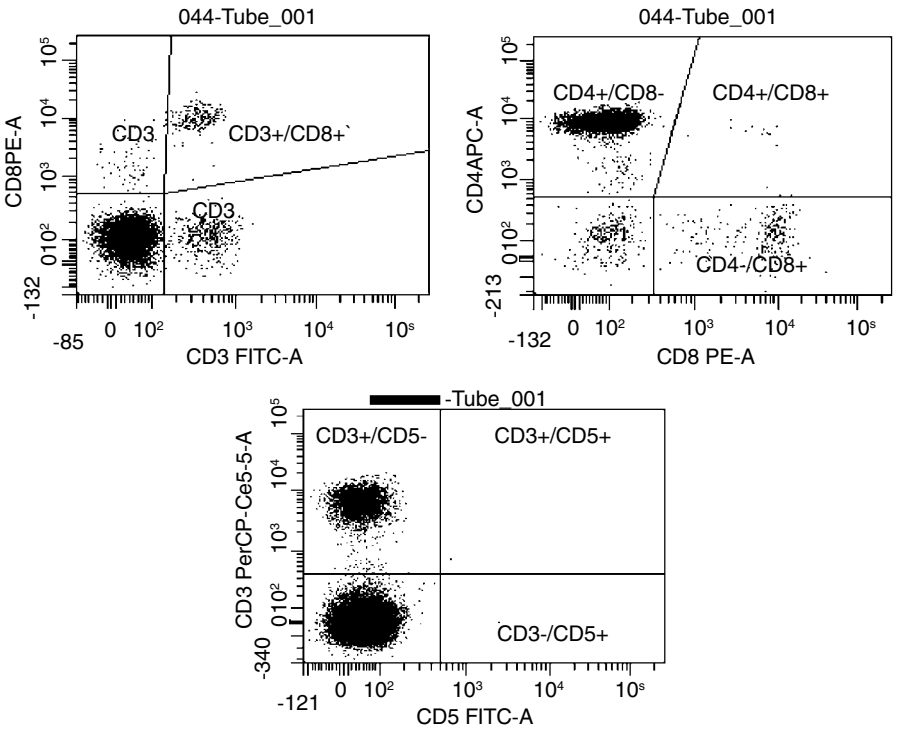


Рис. 2. *Грибовидный микоз / синдром Сезари (первичная Т-клеточная кожная лимфома). Опухолевые клетки составляют 90% среди лимфоцитов с атипичным иммунофенотипом CD4+CD2+CD3-CD8-CD7-CD5-.*

В статье мы кратко познакомили читателей с принципом метода проточной цитометрии и некоторыми возможностями этой технологии для

применения в клинической практике. Это лишь малая доля исследовательских методик из числа возможных, выполняемых методом проточной цитометрии. Практически по каждому разделу цитометрического анализа есть современная, доступная литература на русском языке, и в списке работ мы представляем часть из них.

Список использованной литературы

1. *Козлов В.А., Борисов А.Г., Смирнова С.В., Савченко А.А.* Практические аспекты диагностики и лечения иммунных нарушений: руководство для врачей. Новосибирск: Наука, 2009. 274 с.

2. *Луговская С.А., Почтарь М.Е.* Гематологический атлас. М. – Тверь: ООО «Издательство Триада», 2011. С. 5–9.

3. *Луговская С.А., Почтарь М.Е., Тупицын Н.Н.* Иммунофенотипирование в диагностике гемобластозов. М. – Тверь: ООО «Издательство Триада», 2005. С. 5-9.

4. *Орфао А.* Стратегия EuroFlow и инструменты анализа данных при злокачественных гематологических опухолях / Под ред. Тупицына Н.Н. М.: Иммунология гемопоэза. Издательская группа РОНЦ имени Н.Н. Блохина РАМН, 2011. Т. 8. С. 172–222.

5. *Хайдуков С.В., Зурочка А.В., Черешнев В.А.* Цитометрический анализ в клинической иммунологии. Екатеринбург: УрО РАН, 2011. 220 с.

6. *Хайдуков С.В., Байдун Л.В.* Современные подходы к оценке клеточной составляющей иммунного статуса // Медицинский алфавит. 2015. № 8. С. 44–51.

7. *Bowness P.* HLA B27 in health and disease: a double-edged sword? // Rheumatology. 2002. Vol. 41. Issue 8. P. 857–868.

8. *Gonzalez B.E., Mercado C.K., Johnson L. et al.* Early markers of late onset sepsis in premature neonates: clinical, hematological and cytokine profile // J. Perinat. Med. 2003. Vol. 31. P. 60–68.

9. *Michova A., Abugalia M., Ivanova T. et al.* Compresion of two-flow cytometry method for basophil degranulation in patients sensitized to grass pollen // Allergy. 2006. Vol. 61 (9). P. 1078–1083.

10. *Ogilvie C., Jackson R., Leach M., McKay P.* Sezary syndrome: diagnosis and management // J R Coll Physicians Edinb. 2012. Vol. 42 (4). P. 317–321. doi: 10.4997/JRCPE.2012.408.

11. *Rawstron A.C., Gregory W.M., de Tute R.M. et al.* Minimal residual disease in myeloma by flow cytometry: independent prediction of survival benefit per log reduction // Blood. 2015. Vol. 125 (12). P. 1932–1935. doi: 10.1182/blood-2014-07-590166. Epub 2015 Feb 2.

Оценка потерь лейкоцитов и эритроцитов в моче при центрифугировании с помощью метода проточной уроцитометрии

Е.Л. Семикина

д-р мед. наук, зав. централизованной клинико-диагностической лабораторией,

Т.В. Ходунова

канд. мед. наук, старший научный сотрудник,

Т.С. Каманова

врач клинической лабораторной диагностики централизованной КДЛ

ФГБУ «Научный центр здоровья детей»

Потери клеток мочевого осадка при центрифугировании – основные аналитические ошибки общего анализа мочи. Известно, что скорость осаждения клеток зависит от удельного веса клетки, ее размера, удельного веса и вязкости мочи, от режима центрифугирования (T. Ishii, 2003). Технология проточной уроцитометрии (Sysmex UF 1000i) исключает подобные ошибки, значительно повышая точность исследования.

Проведено исследование для оценки потерь клеток мочевого осадка при центрифугировании и связанных с этим диагностических погрешностей.

Оценено 150 последовательных проб мочи, при выполнении общих анализов все пробы подсчитаны на анализаторе UF 1000i, затем каждая проба разделена на 2 части, обе порции центрифугированы (2000 об/мин. 445 д, 10 минут); одна ресуспендирована и повторно просчитана на анализаторе для оценки разрушения клеток; из второй порции взята надосадочная жидкость и просчитана на анализаторе для определения количества неосажденных клеток.

Результаты оценки средних потерь лейкоцитов не выявили существенных погрешностей, риск диагностических ошибок минимальный (таблица 1).

Таблица 1

Среднее количество лейкоцитов разрушенных при центрифугировании и оставшихся в супернатанте

	Лейкоциты, разрушенные при центрифугировании, %, min-max	Лейкоциты, оставшиеся в супернатанте, %, min-max
Всего	7,50% (0,12–14,50)	0,29% (0–0,78)
Норма	15,25% (1,85–19,09)	0,3 (0–1,48)
Микролейкоцитурия 20–100 клеток в 1 мкл	6,84% (0,41–10,65)	0,32% (0,03–0,82)
Макролейкоцитурия Более 100 в 1 мкл	3,62% (0,64–7,83)	0,25% (0,11–0,45)

При оценке средних потерь эритроцитов получены данные о существенных изменениях эритроцитов, за счет чего возможны диагностические ошибки (таблица 2).

Таблица 2

Среднее количество эритроцитов разрушенных при центрифугировании и оставшихся в супернатанте

	Эритроциты, разрушенные при центрифугировании, %, min-max	Эритроциты, оставшиеся в супернатанте, %, min-max
Всего	14,64% (6,36–23,52)	6,74% (1,65–25,77)
Норма	16,56% (15,00–29,79)	7,87% (5,08–23,41)
Микрогематурия 20–100 клеток в 1 мкл	18,89% (9,57–20,59)	11,11% (2,42–25,85)
Макрогематурия Более 100 клеток в 1 мкл	6,55% (3,25–18,91)	0,88% (0,51–4.89)

Мы считали наиболее важным анализ изменений каждой конкретной пробы с точки зрения искажений результатов, а для этого оценили – как часто после центрифугирования происходило диагностически значимое снижение уровня лейкоцитов и эритроцитов, учитывались отклонения

более 10%. При этом учитывалась выраженность лейкоцитурии и гематурии; пробы с нормальным числом клеток не оценивались (не имеет клинического смысла).

Для лейкоцитов: проб с искажениями за счет клеток, оставшихся в супернатанте, было 1,4%, уровень потерь – 12–14%; проб с искажениями за счет разрушения клеток 7,5%, уровень потерь – 10–48% (в среднем 23%). Частота искажений за счет разрушения – не более 12%.

Распределение проб по содержанию лейкоцитов	**Пробы с искажениями за счет разрушения**
А. 20–100 в 1 мкл – 58 проб	7 (12%)
Б. Свыше 100 в 1 мкл – 40 проб	1 (2,5%)

Для эритроцитов: проб с искажениями за счет разрушения клеток было 21%, уровень потерь – 11–80% (в среднем 28%). Частота искажений за счет разрушения эритроцитов значительная – 23–31%.

Распределение проб по содержанию эритроцитов	**Пробы с искажениями за счет разрушения**
А. 20–100 в 1 мкл – 45 проб	14 (31%)
Б. Свыше 100 в 1 мкл – 43 пробы	10 (23%)

Корреляционный анализ не выявил значимого влияния удельного веса и уровня протеинурии на потери клеток при центрифугировании.

Таким образом, при проведении исследования уровня лейкоцитов мочи этап центрифугирования не вносит существенных искажений в полученный результат, риск диагностических ошибок незначительный. Искажения уровня эритроцитов при центрифугировании гораздо более серьезны, есть реальная опасность диагностических искажений, особенно при микрогематурии. При оценке таких образцов требуется максимальная аналитическая точность, которая обеспечивается исследованием нативной мочи с помощью метода проточной уроцитометрии (технология Sysmex UF 100i).