Е.Э. Западинская, О.А. Тихонова, И.И. Еремин, В.Ю. Нугис, Ю.А. Жгутов, М.Г. Козлова

Сравнительный анализ информативности теста Be-LPT по изучению стимуляции пролиферации лимфоцитов у лиц, контактировавших с бериллием

E.E. Zapadinskaja, O.A. Tihonova, I.I. Eremin, V.Yu. Nugis, Ju.A. Zhgutov, M.G. Kozlova

Comparative Analysis of Be-LPT Test Informativity for Study of Lymphocyte Proliferation Stimulation in Persons Exposed to Beryllium

РЕФЕРАТ

Цель: Разработать критерии и алгоритм диагностики хронической бериллиевой болезни с помощью лабораторных методов *in vitro* для своевременного выявления лиц, предрасположенных к развитию данного пневмокониоза.

Материал и методы: В настоящее время тест пролиферации лимфоцитов с бериллием (BeLPT тест) является основным методом для выявления состояния гиперчувствительности к бериллию при скрининге работников бериллиевых производств. В России данная методика не получила широкого применения. В настоящем исследовании цитометрический BeLPT тест был использован для измерения пролиферации лимфоцитов в группах пациентов, подвергшихся воздействию бериллия (24 человека) и контрольных пациентов, не контактировавших с бериллием (18 человек). Параллельно было изучено влияние бериллия на пролиферацию лимфоцитов периферической крови в ФГА-стимулированных культурах методом дифференцированного окрашивания сестринских хроматид (флуоресцент + Гимза). Данный метод позволяет определять содержание метафаз первого, второго и последующих митозов в культурах и ранее не использовался для определения сенсибилизации людей к бериллию. Основным критерием отбора пациентов в основную группу наблюдения являлся документально подтвержденный факт контакта с соединениями бериллия.

Результаты: Специфическая сенсибилизация у больных основной группы с помощью теста BeLPT была выявлена только у одного человека. Следующие результаты были получены с помощью метода флуоресцент + Гимза: как в основной, так и контрольной группах наблюдалась тенденция к ускорению пролиферации лимфоцитов в культуре при добавлении $BeSO_4$ в конечной концентрации 1 мкМ. Однако при больших концентрациях $BeSO_4$ (10 и 100 мкМ) в группе больных-носителей бериллия в среднем наблюдался возврат к тому же уровню пролиферации, как и в культурах без бериллия. Напротив, в контрольной группе стимулирующий эффект сохранялся.

Выводы: 1. Пока нет возможности достоверно оценить информативность BeLPT теста, т.к. в России нет стандартного протокола данной методики и общепринятых вариантов расшифровки результатов анализа.

2. Для повышения достоверности полученных результатов и более точной интерпретации эффективности BeLPT теста необходимо увеличить число наблюдений (число лиц в когортах).

Ключевые слова: *хроническая бериллиевая болезнь, пролиферация лимфоцитов, тест BeLPT, метод флуоресцент + Гимза*

ABSTRACT

Purpose: A development of criteria and algorithm of chronic beryllium disease diagnosis using non-invasive laboratory techniques for the early detection of individuals predisposed to this pneumoconiosis.

Material and methods: Currently beryllium lymphocyte proliferation testing (BeLPT) is the main method for beryllium hypersensitivity status detection in screening of beryllium production workers in many countries. This technique is not widely used in Russia. In the present study flow cytometric BeLPT was used to measure lymphocyte proliferation in the groups of beryllium-exposed patients (main group — 24 persons) and beryllium-unexposed individuals (control group — 18 persons). Simultaneously we studied the beryllium effect on peripheral blood lymphocyte proliferation in PHA-stimulated cultures by differential staining of sister chromatids (fluorescence + Giemsa). This method allows to determine the content of first, second and subsequent mitosis in cultures. It has not been used for the determination of beryllium sensitization of people. The principal criterion for the selection of patients in the observation group was the documented fact of contact with beryllium compounds.

Results: Specific sensitization in beryllium-exposed patient by BeLPT was found for only one person. The use of the method of fluorescence + Giemsa revealed in both groups of persons a tendency to lymphocyte proliferation stimulation in cultures after $BeSO_4$ addition up to 1 μM final concentration. However, the same level of lymphocyte proliferation was observed at higher concentrations of $BeSO_4$ (10 and 100 μM) for beryllium-exposed patients. In contrast, the control group stimulating effect was held on.

Conclusions: 1. Up to now it is not possible to estimate reliably the informativity of BeLPT because the absence in Russia of the standard protocol for this method use and its results conventional interpretation.

2. It is necessary to increase the number of observations (number of persons in cohorts) to improve the reliability of the results obtained and more accurate interpretation of BeLPT effectiveness.

Key words: *chronic beryllium disease, lymphocyte proliferation, Be-LPT test, fluorescent plus Giemsa method*

Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И.Бурназяна ФМБА России, Москва. E-mail: fmbc-fmba@bk.ru

A.I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of FMBA, Moscow, Russia. E-mail: fmbc-fmba@bk.ru

Введение

Хронический бериллиоз отличается от большинства пневмокониозов, поскольку является иммунологической клеточной реакцией гиперчувствительности замедленного типа. В связи с этим, с целью выявления сенсибилизации и иммунологической толерантности среди лиц, имеющих контакт с бериллием (Be) и его соединениями, а также для обследования больных с кожными и легочными поражениями, используются иммуноаллергологические тесты. К ним относят определение антибериллиевых антител в реакции связывания комплемента, определение лимфоцитов с рецепторами к бериллию и Е-розеткоусилением под влиянием бериллия. К сожалению, ни один из них не отличается высокой информативностью, чувствительностью и специфичностью. К недостаткам кожной пробы Куртиса (накожные аппликации растворимых солей бериллия) относят вероятность вызвать активизацию болезни у больных бериллиозом, а у здорового человека — повышенную чувствительность к этому металлу. Определенные сложности вызывает и трансбронхиальная биопсия и биопсии легких. По данным американских коллег, из 240 трансбронхиальных биопсий только в 80 случаях получен положительный результат, при этом рекомендуется брать не менее 5 кусочков, что увеличивает риск перфорации и кровотечения [1].

В 1989 г. было предложено изучать пролиферацию лимфоцитов бронхоальвеолярного лаважа или крови, как реакцию на проникновение бериллия в организм (BeLPT тест) [2, 3]. Положительная реакция лимфоцитов крови (стимуляция пролиферации) в итоге постановки данного теста свидетельствует о сенсибилизации человека к бериллию.

Последние перекрестные исследования показывают, что число людей, сенсибилизированных к бериллию (5–21 %), и число больных хроническим бериллиозом (3–21 %), по данным различных авторов, находится в широких границах [4]. Столь неоднозначные показатели в частоте случаев предрасположенности к хронической бериллиевой болезни стали одной из причин, обусловивших проведение данной работы.

Специализированный тест пролиферации лимфоцитов с бериллием (BeLPT тест) выявляет избыточную реакцию иммунной системы на бериллий [4]. Цитогенетический метод дифференциального окрашивания сестринских хроматид (флуоресцент + Гимза — FPG-метод) позволяет определять содержание метафаз первого, второго и последующих митозов в культурах лимфоцитов и, таким образом, производить сравнительную оценку интенсивности их пролиферации. Ранее данный подход использовали, например, для изучения радиационно-индуцированной задержки пролиферации клеток в культурах лимфоцитов периферической крови людей после облучения *in vitro* в различных дозах [5]. Нам неизвестны работы, в которых данная методика применялась бы у больных бериллиозом.

В ходе работы планировалось проверить гипотезу о возможности подтвердить наличие сенсибилизации человека к бериллию с помощью двух различных методик, при условии совпадения результатов. Данный подход в диагностике позволил бы избежать таких инвазивных диагностических методов, как торакотомия и трансбронхиальная пункционная биопсия легкого, обязательных для морфологического подтверждения диагноза.

По данным литературы, в настоящее время существует два варианта интерпретации BeLPT теста. В первом случае результаты тестов BeLPT рассматривают как ненормальные (AB), пограничные (BL) или нормальные (NL) [6]. Лица, у которых выявлены аномальные результаты теста BeLPT, подвергаются более высокому риску развития хронического бериллиоза.

Для выполнения теста BeLPT Т-лимфоциты инкубируют в среде с сульфатом бериллия, используя раствор трех концентраций в течение двух периодов времени. В результате в общей сложности получают шесть различных проб инкубации. Затем сравнивают результаты, полученные в ходе инкубации с сульфатом бериллия и без него. Относительные уровни для BeLPT интерпретируются следующим образом: (А) нормальный результат теста (NL) — 0 из 6 инкубаций с Be повышены; (Б) пограничный результат теста (BL) — 1 из 6 инкубаций с Be повышены; (В) аномальные результаты теста (AB) — 2 или больше инкубаций с Be повышены. Однако, по данным литературы, отмечено, что нет единого мнения относительно оценки результатов данного лабораторного метода, поскольку продолжительность периода инкубации и концентрация растворов сульфата бериллия в лабораториях различны [7].

В связи с существующими разногласиями относительно результатов теста и несоответствием статистических данных эксперты предложили следующие критерии BeLPT теста, а именно: (А) один ненормальный результат, (Б) один ненормальный и один пограничный результат и (С) два аномальных результата [8]. По данной методике два аномальных результата принято использовать как «золотой стандарт» в исследовании сенсибилизации к бериллию. Считают, что уровень экспозиции бериллия оказывает влияние на интерпретацию результатов данного анализа [8]. Мнения исследователей в области заболеваний, вызванных бериллием, относительно эффективности BeLPT теста неоднозначны и противоречивы. Описаны случаи, когда значения BeLPT теста колеба-

лись с течением времени у одного и того же больного с хроническим бериллиозом, доказанным в результате биопсии [9]. Встречаются публикации, в которых указывают на положительный результат BeLPT теста приблизительно у 1 % лиц, никогда не контактировавших с бериллием [10].

Таким образом, основываясь на данных литературных источников, можно заключить, что к настоящему времени нет определенности в стандартах проведения BeLPT теста и, соответственно, критериев специфичности и чувствительности данного метода. Этот аргумент еще раз подтверждает необходимость отработки методики постановки BeLPT теста с целью адаптации его для практической медицины в России. Следует отметить, что, по данным литературы, к сегодняшнему дню принято рассматривать три категории эффектов, возникающих при воздействии бериллия: 1) бериллиоз (хроническое заболевание); 2) субклиническое течение бериллиоза, характеризующееся аномальным результатом теста BeLPT и биопсией легкого, но без клинических проявлений; 3) сенсибилизация к бериллию (BES) — аномальный BeLPT тест [11].

Материал и методы

Для выполнения поставленных задач было сформировано две группы больных: основная (N = 24) и контрольная (N = 18). Основным критерием отбора пациентов в основную группу наблюдения являлся документально подтвержденный факт контакта с соединениями бериллия. Подбор больных для контрольной группы наблюдения проводился из числа пациентов с патологией бронхо-легочной системы, не имевших контакт с бериллием и сопоставимых по полу, возрасту, основному и сопутствующим диагнозам. Алгоритм обследования пациентов основной и контрольных группах включал сбор анамнеза, пальпацию, перкуссию и аускультацию; лабораторные исследования крови и мочи; радиологические методы исследования легких (рентгенография, компьютерная и магнитно-резонансная томография); исследование функции дыхания (спирометрия, бодиплетизмография, изучение диффузионной способности легких). По показаниям проводилась бронхоскопия с исследованием смывов из трахеобронхиального дерева, ЭКГ, ЭхоКГ.

Исследование стимуляции пролиферации лимфоцитов периферической крови под воздействием бериллия проводили двумя методами: а) с помощью теста BeLPT и б) FPG-методикой. Периферическую кровь получали венопункцией из кубитальной вены пациентов в стерильные вакутейнеры фирмы Becton Dickinson (США) объемом 10 мл с гепарином лития.

Тест пролиферации лимфоцитов с бериллием (BeLPT)

В настоящей работе применили современный вариант данного теста без использования мечения ДНК делящихся клеток ^{3}H-тимидином. Новый подход основан на использовании 5(6)-карбоксифлуоресцеин диацетат N-сукцинимидил эфира (CFSE) и цитофлуорометрии. Данное вещество проникает в клетки, ковалентно связывается с аминогруппами (NH_2) белков и под действием эстераз превращается в сильно флуоресцирующую субстанцию [12]. Образовавшаяся связь сохраняется во время всего жизненного цикла клетки, и по снижению флуоресценции можно следить за ее последующими делениями. Этот вариант предположительно может оказаться более чувствительным, чем стандартный метод BeLPT [13]. В нашем исследовании была применена модификация методики, приведенной в работе [14]. В соответствии с ней из крови методом градиентного центрифугирования выделялись лимфоциты, которые затем окрашивали CFSE и культивировали в среде с бериллием в концентрации 10 и 100 мкМ на протяжении 7 сут. В качестве контроля использовались лимфоциты, культивировавшиеся в тех же условиях, но без добавления бериллия, а также лимфоциты, культивировавшиеся в тех же условиях с добавлением митогена фитогемагглютинина (ФГА), но без бериллия. Повышение пролиферативного ответа на ФГА может свидетельствовать о наличии инфекции или какой-либо аутоиммунной патологии. Для анализа пролиферативной активности культур Т-лимфоцитов, относящихся к иммунофенотипически очерченным субпопуляциям, было выполнено проточное цитофлюориметрическое исследование, для проведения которого культуры клеток окрашивались антителами, конъюгированными с флуоресцентными метками CD3-APC, CD4-PE и CD8-PE-Cy5,5.

Методика дифференцированного окрашивания сестринских хроматид

Предварительно на материале от некоторых пациентов было показано, что культивирование лимфоцитов без стимуляции ФГА с добавлением сульфата бериллия ($BeSO_4$) или без него не приводит к появлению митозов. Поэтому лимфоциты периферической крови больных-носителей бериллия и контрольной группы культивировали в темноте при температуре 37 °C в среде RPMI-1640 (9 мл), содержащей фитогемагглютинин (ФГА) (фирма «ПанЭко», Россия), антибиотики стрептомицин и пенициллин (растворены предварительно в среде RPMI-1640) и 5-бромдезоксиуридин (20 мкг/мл) (фирма Sigma, США). Кровь от каждого пациента использовалась для постановки трех вариантов культур: без $BeSO_4$

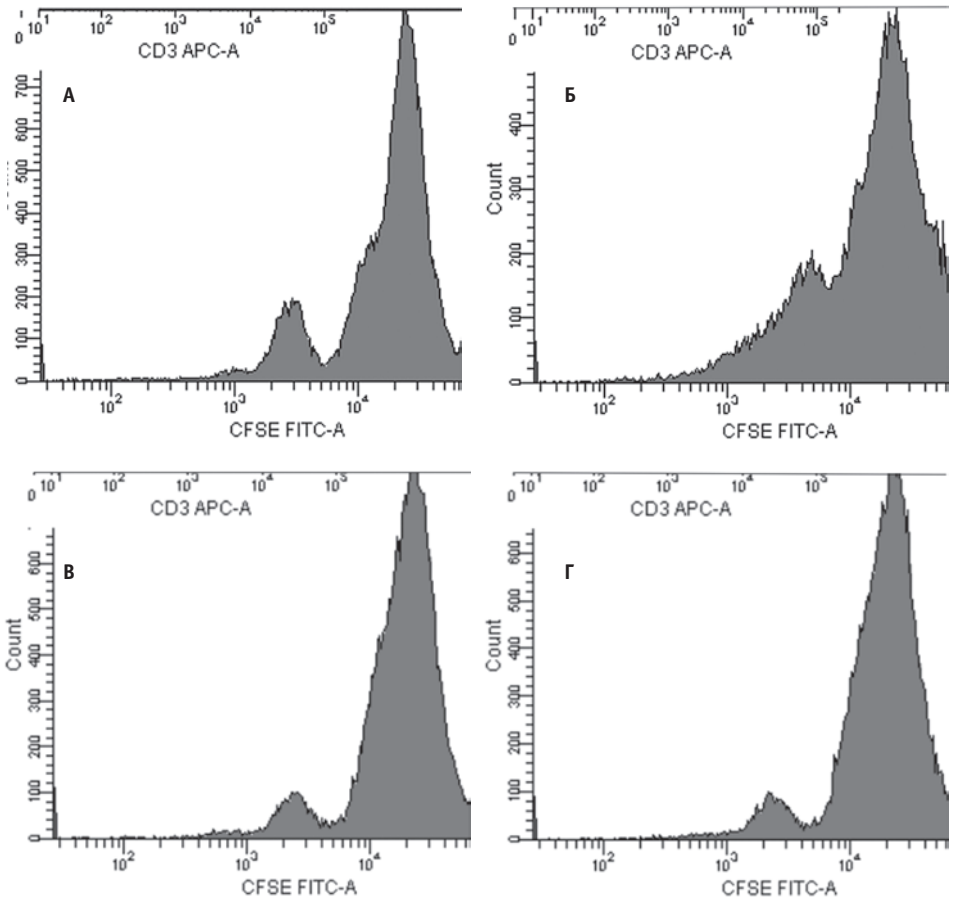

Рис. 1. Пример изучения на проточном цитофлуориметре пролиферации меченных CFSE CD3+-Т-лимфоцитов одного из контрольных пациентов (пояснения в тексте):
А — контрольная проба,
Б — проба с добавлением ФГА;
В — проба с добавлением $BeSO_4$ в концентрации 10 мкМ;
Г — проба с добавлением $BeSO_4$ в концентрации 100 мкМ

и с ним в двух конечных концентрациях 1 и 10 мкМ или 10 и 100 мкМ. Продолжительность инкубации культур составляла 72 ч. За 2,5 ч до конца инкубации в культуры добавляли колхицин (0,5 мкг/мл). Для идентификации клеток в первом и последующих митозах в культуре применяли модификацию FPG-методики [5]. Препараты хромосом обрабатывали в течение 10 мин 0,004 %-ным раствором акрифлавина. Краситель смывали водопроводной водой, препараты покрывали 0,07 М раствором двузамещенного фосфорнокислого натрия и в течение 20 мин облучали ультрафиолетовым светом на расстоянии 10–15 см от источника (лампа для кварцевания). Затем препараты погружали на 5 мин в насыщенный раствор гидроокиси бария, промывали их в водопроводной воде и окрашивали азур-эозином. Клетки первого митоза в культуре идентифицировали по одинаковой окраске сестринских хроматид (как на препаратах с «рутинной» окраской хромосом). В клетках второго митоза в каждой хромосоме одна сестринская хроматида имела темную, а другая — светлую окраску. В метафазах последующих генераций могло наблюдаться два варианта окраски: 1) увеличивалось количество светлых хроматид так, что могли появляться хромосомы, состоящие из двух сестринских хроматид; 2) наблюдалось три варианта окраски сестринских хроматид: светлая, более темная и еще более темная. При анализе препаратов определялось процентное содержание клеток различных генераций в культуре.

Результаты и обсуждение

В результате исследования стимуляции пролиферации лимфоцитов с бериллием (BeLPT) было отмечено, что у всех больных, кроме одного пациента из основной группы, добавление бериллия в лунку с контрольным образцом существенно не изменяло пролиферацию лимфоцитов независимо от концентрации сульфата бериллия. Во всех пробах с ФГА у всех больных из контрольной группы, кроме одного, наблюдалось достоверное увеличение пролиферативной активности лейкоцитов. На рис. 1 показано, что у данного больного из группы контроля пролиферативная активность лимфоцитов примерно одинакова как в эталонном образце (А), так и в пробах с ФГА (Б) и бериллием (В, Г). Снижение пролиферативного ответа на ФГА свидетельствует о наличии иммунодефицита, однако причины его могут быть различными.

Таблица 1

Процент метафаз первого, второго и последующих митозов в культурах лимфоцитов периферической крови носителей бериллия и представителей контрольной группы

№ п/п	Ф.И.О.	Возраст	Пол	Концентрация $BeSO_4$ в культуре, мкМ	Число сосчитанных метафаз	Процентное содержание в культуре метафаз		
						первого митоза	второго митоза	последующих митозов
Носители бериллия								
1	А.В.Н.	69	м	0	200	87,5	11,5	1
				1	200	94	6	0
				10	50	100	0	0
2	А.В.М.	77	м	0	200	66	21	13
				1	200	48,5	23	28,5
				10	200	78	16,5	5,5
3	А.В.В. 1	70	м	0	200	17	22	61
				1	200	10,5	14,5	75
				10	200	19	16	65
4	З.А.В.	56	м	0	200	26	29	45
				1	200	20	25	55
				10	200	11,5	21	67,5
5	К.П.М.	81	м	0	200	67,5	27,5	5
				1	200	66	30	4
				10	38	94,7	5,3	0
6	К.А.В.	85	м	0	0	—	—	—
				1	0	—	—	—
				10	0	—	—	—
7	К.А.А.	64	ж	0	0	—	—	—
				1	0	—	—	—
				10	0	—	—	—
8	М.В.К. 1	62	м	0	200	98,5	1,5	0
				1	200	79,5	19,5	1
				10	200	88,5	11	0,5
9	М.В.К. 2	62	м	0	200	10,5	24,5	65
				1	200	5	24,5	70,5
				10	200	8	27	65
10	М.А.В.	71	ж	0	200	94,5	4	1,5
				1	200	40	12,5	47,5
				10	110	93,6	6,4	0
11	М.Н.П.	82	ж	0	200	8,5	18	73,5
				1	200	42,5	36	21,5
				10	200	34,5	40	25,5
12	О.Г.И.	76	ж	0	200	46,5	19	34,5
				1	200	29,5	28,5	42
				10	200	17	27,5	55,5
13	П.Б.А.	82	м	0	200	88,5	6,5	5
				1	200	45,5	28	26,5
				10	200	74	12,5	13,5
14	Р.А.А	81	м	0	166	100	0	0
				1	200	27	42	31
				10	200	78	19,5	2,5
15	С.Л.А.	73	ж	0	200	37	13,5	49,5
				1	200	23	31	46
				10	200	25,5	26,5	48
16	Т.Н.А.	75	ж	0	200	17,5	13,5	69
				1	200	16,5	26	57,5
				10	200	9,5	11,5	79
17	У.В.М.	83	м	0	200	100	0	0
				1	200	35	49,5	15,5
				10	200	87	11	2
18	Х.Р.Ф.	71	ж	0	200	34	30	36
				1	200	19	25	56
				10	200	26,5	30	43,5
19	Ш.Р.А.	74	ж	0	200	54	12,5	33,5
				1	200	31,5	27	41,5
				10	200	84	2	15
20	А.В.В. 2	69	м	0	200	54	29,5	16,5
				10	200	55	30	15
				100	200	59,5	29,5	11

№ п/п	Ф.И.О.	Возраст	Пол	Концентрация $BeSO_4$ в культуре, мкМ	Число сосчитанных метафаз	Процентное содержание в культуре метафаз		
						первого митоза	второго митоза	последующих митозов
21	Б.Г.И.	84	ж	0	200	56	31,5	12,5
				10	200	30,5	26	43,5
				100	200	74	18	8
22	К.М.В.	66	м	0	200	100	0	0
				10	200	61	24,5	14,5
				100	100	84	7	9
23	М.Н.И.	75	ж	0	200	64,5	17	18,5
				10	200	74,5	10,5	15
				100	42	95,2	0	4,8
24	П.О.В.	83	ж	0	0	—	—	—
				10	0	—	—	—
				100	0	—	—	—
Контрольная группа								
1	Б.В.М.	51	м	0	0	—	—	-
				1	0	—	—	—
				10	0	—	—	—
2	Б.Г.И.	70	м	0	200	34,5	17,5	48
				1	200	14,5	20,5	65
				10	200	35	14,5	50,5
3	Е.Л.Н.	56	ж	0	200	97,5	0,5	2
				1	200	17,5	21	61,5
				10	200	38	37,5	24,5
4	И.Е.А.	49	м	0	200	64	16,5	19,5
				1	200	50	25	25
				10	200	58	11	31
5	Л.Р.П.	64	ж	0	200	13	24	63
				1	200	17	21	62
				10	200	18,5	15	66,5
6	П.Л.А.	57	м	0	145	97,9	0,7	1,4
				1	200	91	2	7
				10	200	100	0	0
7	С.И.И.	73	м	0	200	82,5	5,5	12
				1	200	21,5	19,5	59
				10	200	31	22	47
8	Ф.А.А.	64	ж	0	200	47	23	30
				1	200	35,5	30	34,5
				10	200	20,5	19,5	60
9	Б.З.П.	77	ж	0	75	93,3	4	2,7
				10	200	60,5	14	25,5
				100	200	72	8	20
10	К.В.Н.	63	м	0	0	—	-	-
				10	0	—	—	—
				100	0	—	-	-
11	К.Г.А.	73	ж	0	200	94,5	2	3,5
				10	200	75	6,5	18,5
				100	200	86	2,5	11,5
12	К.О.Е.	71	м	0	200	82,5	1,5	16
				10	200	35,5	4	60,5
				100	200	63	4	33
13	М.А.Г.	74	ж	0	200	96,5	1,5	2
				10	200	63,5	24	12,5
				100	100	71	15	14
14	С.М.С.		м	0	47	100	0	0
				10	200	49,5	32,5	18
				100	200	50,5	28	21,5
15	С.В.И.	65	м	0	200	59	6,5	34,5
				10	200	42	37,5	20,5
				100	100	48	31	21
16	Т.А.В.	73	ж	0	200	87,5	5	7,5
				10	200	73,5	5	21,5
				100	200	61	22,5	16,5
17	Ч.А.В.	44	м	0	200	74	6	20
				10	200	28	35	37
				100	200	56	9	35
18	Я.А.Г.	67	м	0	200	89,5	3	7,5
				10	200	75,5	12	12,5
				100	0	—	—	—

Таблица 2

Выявление по величине p (уровню значимости) достоверности различий в содержании клеток первой и последующих генераций в культурах лимфоцитов с разной концентрацией внесенного $BeSO_4$ у одних и тех же представителей носителей бериллия и контрольной группы

№ п/п	Ф.И.О.	Величина *p* при сравнении содержания клеток первой и последующей генераций в культурах с разной указанной концентрацией $BeSO_4$ (*)				
		0–1 мкМ	0–10 мкМ	0–100 мкМ	1–10 мкМ	10–100 мкМ
Носители бериллия						
1	А.В.Н.	**0,0249** (+)	**0,0038** (+)	—	0,0687 (+)	—
2	А.В.М.	**0,0004**	**0,0075** (+)	—	**0,0000** (+)	—
3	А.В.В.1	0,0591	0,6027 (+)	—	0,0165 (+)	—
4	З.А.В.	0,1540	**0,0002**	—	**0,0196**	—
5	К.П.М.	0,7502	**0,0007** (+)	—	**0,0004** (+)	—
6	К.А.В.	—	—	—	—	—
7	К.А.А.	—	—	—	—	—
8	М.В.К.1	**0,0000**	**0,0000**	—	**0,0141** (+)	—
9	М.В.К.2	**0,0397**	0,3882	—	0,2236 (+)	—
10	М.А.В	**0,0000**	0,7557	—	**0,0000**	—
11	М.Н.П.	**0,0000** (+)	**0,0000** (+)	—	0,1002	—
12	О.Г.И.	**0,0005**	**0,0000**	—	**0,0031**	—
13	П.Б.А.	**0,0000**	**0,0002**	—	**0,0000** (+)	—
14	Р.А.А	**0,0000**	**0,0000** (+)	—	**0,0000** (+)	—
15	С.Л.А.	**0,0023**	**0,0131**	—	0,5597 (+)	—
16	Т.Н.А.	0,7901	**0,0192**	—	**0,0374**	—
17	У.В.М.	**0,0000**	**0,0000**	—	**0,0000** (+)	—
18	Х.Р.Ф.	**0,0007**	0,1025	—	0,0736 (+)	—
19	Ш.Р.А.	**0,0000**	**0,0000** (+)	—	**0,0000** (+)	—
20	А.В.В.2	—	0,8408 (+)	0,2669 (+)	—	0,3630 (+)
21	Б.Г.И.	—	**0,0000**	**0,0002** (+)	—	**0,0000** (+)
22	К.М.В.	—	**0,0000**	**0,0000**	—	**0,0001** (+)
23	М.Н.И.	—	**0,0299** (+)	**0,0001** (+)	—	**0,0025** (+)
24	П.О.В.	—	—	—	—	—
Контрольная группа						
1	Б.В.М.	—	—	—	—	—
2	Б.Г.И.	**0,0000**	0,9164 (+)	—	**0,0000** (+)	—
3	Е.Л.Н.	**0,0000**	**0,0000**	—	**0,0000** (+)	—
4	И.Е.А.	**0,0000**	**0,0560**	—	0,1085 (+)	—
5	Л.Р.П.	0,2626 (+)	0,1311 (+)	—	0,6946 (+)	—
6	П.Л.А.	**0,0117**	0,0742 (+)	—	**0,0000** (+)	—
7	С.И.И.	**0,0000**	**0,0000**	—	0,0308 (+)	—
8	Ф.А.А.	**0,0195**	**0,0000**	—	**0,0003**	—
9	Б.З.П.	—	**0,0000**	**0,0001**	—	**0,0150** (+)
10	К.В.Н.	—	—	—	—	—
11	К.Г.А.	—	**0,0000**	**0,0042**	—	**0,0055** (+)
12	К.О.Е.	—	**0,0000**	**0,0000**	—	**0,0000** (+)
13	М.А.Г.	—	**0,0000**	**0,0000**	—	0,1961 (+)
14	С.М.С.	—	**0,0000**	**0,0000**	—	0,8415 (+)
15	С.В.И.	—	**0,0001**	**0,0210**	—	0,3237 (+)
16	Т.А.В.	—	**0,0004**	**0,0000**	—	**0,0077**
17	Ч.А.В.	—	**0,0000**	**0,0002**	—	**0,0000** (+)
18	Я.А.Г.	—	**0,0002**	—	—	—

Примечание:
Жирным шрифтом выделены величины $p < 0,05$.
(*) — знак (+) указывает, что в культуре с большей концентрацией $BeSO_4$ содержится больше клеток первого митоза, чем в культуре с меньшей концентрацией

Таблица 3

Средний процент клеток в первом митозе в культурах с различным содержанием $BeSO_4$ у носителей бериллия и в контрольной группе

Концентрация $BeSO_4$ в культуре, мкМ	Количество культур	Средний процент клеток в первом митозе	Стандартная ошибка среднего значения
Носители бериллия			
0	21	58,5	7,0
1	17	37,2	5,8
10	21	54,7	7,2
100	4	78,2	7,6
Контрольная группа			
0	16	75,8	6,4
1	7	35,3	10,5
10	16	50,2	5,8
100	8	63,4	4,4

При выполнении FPG-методики проводили подсчет клеток различных генераций в культурах лимфоцитов лиц из контрольной группы и группы пациентов-носителей бериллия, включая больных бериллиозом.

В табл. 1 представлены результаты оценки процентного содержания метафаз первого, второго и последующих митозов в исследованных культурах лимфоцитов представителей основной и контрольной группы. Как можно видеть, у 3 носителей бериллия и у 2 пациентов из контрольной группы посадки культур лимфоцитов периферической крови оказались полностью неудачными.

В табл. 2 приведены данные по выявлению статистической значимости различий содержания клеток первой и последующих генераций в культурах лимфоцитов с разным количеством внесенного $BeSO_4$ у одних и тех же пациентов индивидуально. Для статистической обработки использовали критерий χ^2 или точный критерий Фишера, если одна из вариант была меньше 5 [13].

В усредненном виде содержание клеток в первом митозе в культурах разного типа дано в табл. 3. Сравнение по t-критерию Стьюдента не выявило статистически значимых различий между двумя группами ни при одной из использованных концентраций $BeSO_4$, включая 0 мкМ (уровень значимости p варьировал от 0,085 до 0,864). Учитывая высокую индивидуальную вариабельность в норме содержания клеток различных генераций в культурах лимфоцитов периферической крови разных индивидуумов [14], такой результат не вызывает удивления. В то же время, при использовании t-критерия Стьюдента с попарно связанными вариантами было показано, что в контрольной группе процент клеток в первом митозе в культурах без $BeSO_4$ статистически значимо превышал таковой в культурах с концентрацией данного препарата 10 и 100 мкМ (p = 0,0002 и 0,0015 соответственно). При концентрации $BeSO_4$ 1 мкМ содержание клеток первой генерации также было ниже, чем при 0 мкМ, но находилось на грани статистической значимости (p = 0,061). В группе носителей бериллия аналогичная разница в том же направлении была существенна (p = 0,011). Однако при больших концентрациях $BeSO_4$ отличий от культур без бериллия по числу клеток в первом митозе не наблюдалось (p = 0,365 и 0,408).

Таким образом, с нашей точки зрения, как в основной, так и контрольной группах наблюдается тенденция к ускорению пролиферации лимфоцитов в культуре при добавлении $BeSO_4$ в конечной концентрации 1 мкМ. Однако при больших концентрациях $BeSO_4$ в группе больных-носителей бериллия в среднем наблюдается возврат к тому же уровню пролиферации, как и в культурах без бериллия. Напротив, в контрольной группе стимулирующий эффект сохраняется, т.е. ситуация противоположна ожидавшейся. По-видимому, это обусловлено тем, что при действии ФГА количество стимулированных лимфоцитов оказывается больше, чем при специфической стимуляции бериллием. В то же время возможна дополнительная стимуляция бериллием разных групп лимфоцитов, отвечающих на действие ФГА, более выраженная в контрольной группе и ограниченная в группе лиц, которые уже имели контакт с бериллием, т.е. имеет место гипотетическая неспецифическая общая реакция системы Т-лимфоцитов, впервые встретившихся с этим металлом.

Заключение

Подводя итог проделанной части работы и принимая во внимание полученные результаты, а также литературные данные, считаем, что:

1. На настоящем этапе работы нет возможности достоверно оценить результаты использованного нами BeLPT теста, поскольку в России нет стандартного протокола данной методики и общепринятых вариантов расшифровки результатов анализа.
2. Существует необходимость увеличить число наблюдений (число лиц в когортах) для дальнейшего изучения эффективности BeLPT теста на основе применения CFSE.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Newman L.S.1, Mroz M.M., Balkissoon R., Maier L.A.* Beryllium sensitization progresses to chronic beryllium disease: a longitudinal study of disease risk. // Amer. J. Respir. Crit. Care Med., 2005, **171**, No. 1, P. 54–60.
2. *Newman L.S., Kreiss K., KingT.E. Jr. et al.* Pathologic and immunologic alterations in early stages of beryllium disease. Re-examination of disease definition and natural history. // Amer. Rev. Respir. Dis., 1989, **139**, No. 6, P. 1479–1486.
3. *Kreiss K., Newman L.S., Mroz M.M., Campbell P.A.* Screening blood test identifies subclinical beryllium disease. // J. Occup. Med., 1989, **31**, No. 7, P. 603–608.
4. *Schuler C.R.1, Virji M.A., Deubner D.C. et al.* Sensitization and chronic beryllium disease at a primary manufacturing facility. Part 3: Exposure-response among short-term workers. // Scand. J. Work Environ. Health, 2012, **38**, No. 3, P. 270–281.
5. *Пяткин Е.К., Нугис В.Ю.* Использование методики дифференциального окрашивания сестринских хроматид для изучения пролиферативной активности лимфоцитов периферической крови человека в культуре в норме и после γ-облучения *in vitro*. // Радиобиология, 1980, **20**, № 6, С. 871–876.
6. *Middleton D., Kowalski P.* Advances in identifying beryllium sensitization and disease. // Int. J. Environ. Res. Public Health, 2010, No. 7, P. 115–124.
7. *Deubner D.C., Goodman M., Iannuzzi J.* Variability, predictive value, and uses of the beryllium blood lymphocyte proliferation test (BLPT): Preliminary analysis of the ongoing workforce survey. // Appl. Occup. Environ. Hyg., 2001, **16**, No. 5, P. 521–526.
8. *Middleton D.C., Lewin M.D., Kowalski P.J. et al.* The BeLPT: Algorithms and interpretations. // Amer. J. Ind. Med., 2006, **49**, No. 1, P. 36–44.
9. *Maier L.A.* Beryllium health effects in the era of the beryllium lymphocyte proliferation test. // Appl. Occup. Environ. Hyg., 2001, **16**, No. 5, P. 514–520.
10. *Kreiss K., Wasserman S., Mroz M.M., Newman L.S.* Beryllium disease screening in the ceramics industry: blood lymphocyte test performance and exposure-disease relations. // J. Occup. Med., 1993, **35**, No. 3, P. 267–274.
11. *Newman L.S., Mroz M.M., Balkissoon R., Maier L.A.* Beryllium sensitization progresses to chronic beryllium disease: a longitudinal study of disease risk. // Amer. J. Respir. Crit. Care Med., 2005, **171**, No. 1, P. 54–60.
12. *Wallace P.K., Tario J.D. Jr., Fisher J.L. et al.* Tracking antigen-driven responses by flow cytometry: monitoring proliferation by dye dilution. // Cytometry, 2008, **73A**, No. 11, P. 1019–1034.
13. *Milovanova T.N.* Comparative analysis between CFSE flow cytometric and tritiated thymidine incorporation tests for beryllium sensitivity. // Cytometry, 2007, **72B**, No. 4, P. 265–275.
14. *Milovanova T.N., Popma S.H., Cherian S. et al.* Flow cytometric test for beryllium sensitivity. // Cytometry, 2004, **60B**, No. 1, P. 23–30.
15. *Снигирева Г.П., Богомазова А.Н., Новицкая Н.Н. и соавт.* Биологическая индикация радиационного воздействия на организм человека с использованием цитогенетических методов. Медицинская технология №ФС-2007/015-У. — М., 2007, 29 с.
16. *Crossen P.E., Morgan W.F.* Analysis of human lymphocyte cell cycle time in culture measured by sister chromatid differential staining. // Exp. Cell. Res., 1977, **104**, No. 2, P. 453–457.

Поступила: 16.10.2014

Принята к публикации: 19.12.2014