

Zastosowanie cytometrii przepływowej w diagnostyce laboratoryjnej chorób alergicznych.

Using flow cytometry in laboratory diagnosis of allergic diseases.

Wojciech Mędrala, Anna Wolańczyk-Mędrala, Grzegorz Gogolewski

Z Katedry i Kliniki Chorób Wewnętrznych i Alergologii
Akademii Medycznej we Wrocławiu

Pneumonol. Alergol. Pol. 2006, 74, 239:241

Key words: basophil, CD₂₀₃, CD₆₃, flow cytometry, allergic diseases

Bazofile i mastocyty są komórkami efektorowymi reakcji zależnej od IgE, nazywaną także reakcją typu I wg. Gella i Coombsa lub reakcją typu natychmiastowego. Reakcje te leżą u podłoża chorób atopowych takich jak astma oskrzelowa, alergiczny nieżyt nosa, niektóre postacie pokrzywki czy też szoku anafilaktycznego. Ponadto współuczestniczą w patogenezie różnych reakcji anafilaktycznych zachodzących przy udziale innych substancji aktywujących te komórki. Wymienia się tu reakcje immunologiczne aktywujące kaskadę komplementu, którego aktywne czynniki takie jak C3a i C5a doprowadzają do bezpośredniej degranulacji wymienionych typów komórek. Ponadto podkreśla się udział autoprzeciwciał przeciwko IgE, lub przeciwko receptorom dla FcIgE. W przypadku reakcji mediowanych przez przeciwciała IgE kluczowym elementem laboratoryjnej diagnostyki alergologicznej jest próba wykazania obecności w surowicy badanej osoby alergenowo swoistych przeciwciał tej klasy. Wykazanie obecności tych przeciwciał potwierdza stan uczulenia, lecz nie przesądza o tym, czy osoba badana w rzeczywistości będzie reagować na kontakt z tym alergenem. Wymienione prawidłowości są ogólnie znanymi i szeroko przyjętym ograniczeniem tych metod diagnostycznych (8). Kluczową kwestią decydującą o udziale bazofila lub mastocyta w reakcjach zależnych od IgE jest obecność na powierzchni tych komórek wspomnianych przeciwciał. Ich obecność można wykazać w teście skórnym lub za pomocą laboratoryjnych testów pozwalających na ocenę reaktywności tych komórek po inkubacji z podejrzanymi alergenami. Jak wykazały badania własne reaktywność tych komórek może być bardzo zróżnicowana. Chorzy z bardzo dobrymi efektami klinicznymi immunoterapii swoistej cechują się bardzo słabą reaktywnością bazofila, podczas gdy chorzy nie poddani takiej formie terapii notujący burzliwie przebiegające objawy chorobowe cechują się wybitną reaktywnością *in vitro* (10,23). Szeroko znanym jest również fakt, że przeszło 30 procent

naszej populacji ma dodatnie wyniki testów skórnym, podczas gdy tylko u połowy z nich występują objawy chorobowe na tle tego uczulenia (8). Co ciekawe, osoby zdrowe z dodatnimi wynikami testów skórnym z popularnymi aeroalergenami cechują się w badaniach *in vitro* bardzo niską reaktywnością bazofila na stymulację alergenową co jest porównywalne do wspomnianej grupy osób u których osiągnięto bardzo dobre efekty leczenia przy zastosowaniu immunoterapii swoistej (9,10). Dane te wskazują na dużą przydatność testów laboratoryjnych, w których dokonuje się oceny stopnia aktywacji bazofila, głównie ze względu na możliwości udzielenia odpowiedzi, co do różnicowania między stanem realnego klinicznie uczulenia od uczulenia, które nie ma istotności klinicznej.

Na początku lat 90. ubiegłego stulecia wykazano, że aktywowany bazofil wykazuje ekspresję CD63, a zastosowanie znakowanych przeciwciał monoklonalnych przeciwko tej molekuule pozwala na precyzyjną ocenę odsetka aktywowanych bazofilów z zastosowaniem cytometrii przepływowej (7). Technika ta uwzględnia również zastosowanie znakowanych przeciwciał anty IgE, których zadaniem jest identyfikacja puli bazofilów co pozwala na ich wstępne wyodrębnienie z puli wszystkich komórek krwi obwodowej poddanych ocenie cytometrycznej (16,18). Badania w tym zakresie wykazały wysoką przydatność diagnostyczną oceny ekspresji CD63 na powierzchni aktywowanych bazofilów w różnych stanach klinicznych. Przede wszystkim skupiono się na stanach uczulenia na alergeny inhalacyjne, ale badania te prowadzono również na próbkach krwi izolowanych od pacjentów uczulonych na antybiotyki beta laktamowe oraz leki miorelaksanty. Wykazano też dużą zgodność wyników z klasycznym już testem uwalniania histaminy z bazofilów (2,13,14,17,22). Przydatność tej techniki podkreśla się w przypadkach, w których zachodzą trudności z zastosowaniem lub interpretacją wyników osiąganych przy użyciu

klasycznych metod diagnostycznych. Okoliczności te dotyczą małych dzieci, u których nie można wykonać testów skórnych, lub osób, u których notuje się istotne rozbieżności pomiędzy wynikami testów skórnych a danymi z wywiadu lekarskiego (14,21). Wyniki innych badań dostarczyły przekonujących badań w zakresie przydatności omawianego testu w diagnozowaniu stanów uczulenia na lateks i alergii na jady owadów błonkoskrzydłych (19,20). Dotychczas nie udało się jednak w dostatecznym stopniu zoptymalizować tej metody w przypadkach alergii pokarmowej a wstępne doniesienie dotyczące przydatności w zakresie diagnozowania *in vitro* idiosynkrazji aspirynowej wymaga potwierdzenia przez inne grupy badawcze (3,12).

Kolejną, równie interesującą możliwością cytometrycznej oceny stopnia aktywacji bazofoila jest określanie ekspresji cząstki CD203c. Jak wykazały badania Buhringa i wsp., cząstka ta jest obecna na powierzchni bazofofilów, po ich aktywacji jej ekspresja silnie wzrasta (1). Badania w tym zakresie wykazały wysoka wartość diagnostyczną w przypadkach uczuleń na wybrane aeroalergeny i alergeny jadów owadów żądających (4,5,6,15). W niektórych badaniach porównano czułość oznaczania CD203c na powierzchni aktywowanych swoistym alergenem do czułości równoległe wykonywanego testu uwalniania histaminy. Wykazano w nich, że bardzo wysoki odsetek rzędu 90% aktywnych komórek wykazujących wysoką ekspresję tej molekuł, koresponduje z podobnego rzędu uwalnianiem histaminy. Jednakże stosowanie niskich stężeń alergenu powodowało znaczne różnice pomiędzy wynikami obu tych testów. W zależności od użytego alergenu czułość testu cytometrycznego była wyższa od 5 do 100 razy niż testu uwalniania histaminy (5). Autorzy ci są zdania, że ten test wykazuje wyższość nad określaniem ekspresji CD63 na powierzchni bazofofilów, ze względu na to, że ten drugi test identyfikuje bazofofile z zastosowaniem znakowanych przeciwciał anty-IgE, co może prowadzić do niekorzystnych interferencji, jakkolwiek badania Hauswirtha i wsp. wskazują na porównywalną czułość obu testów (4).

W 2004 roku wykazano, że bazofofile osób z filariozą uwalniają histaminę *in vitro* po stymulacji antygenem tych pasożytów. Jednocześnie są zdolne do produkcji interleukiny 4, którą można wykazać na etapie syntezy wewnątrzkomórkowej już po upływie 2 godzin inkubacji przy zastosowaniu techniki cytometrii przepływowej. To jedyna jak do tej pory obserwacja w tym zakresie, lecz budzi uzasadnioną nadzieję, że będzie wstępem do wnikliwych badań na polu diagnostyki alergologicznej (11). Taką prawidłowość w przeszłości można było odnotować wielokrotnie.

Na obecnym etapie badań trudno przesądzić, który z wymienionych testów diagnostycznych okaże się najbardziej przydatny, a co ważniejsze, czy doczeka się wdrożenia do praktyki laboratoryjnej. Testy te są obecnie na etapie dopracowywania szczegółów technicznych i drobiazgowych badań w kontekście ich czułości i swoistości. Brak jest dostatecznie dobrze udokumentowanych badań porównawczych, pomiędzy tymi testami, których wyniki niewątpliwie będą w przyszłości opublikowane. Warto nadmienić, że żaden test wykorzystujący badania z wykorzystaniem komórek nie znalazł do tej pory zastosowania praktycznego, włączając w to najstarszego przedstawiciela – test uwalniania histaminy z bazofofilów. Powody tego stanu rzeczy były różne. Do niedawna test uwalniania histaminy był bardzo skomplikowaną i drogą metodą. Dopiero od kilku lat można wykonywać go w sposób stosunkowo prosty i relatywnie tańszy. Podobnie było z testem wytwarzania leukotrienu C4 – procedurą czasochłonną i dość kosztowną. Jednak powodem decydującym o wdrożeniu takich testów są wskazania do ich wykonania celem zastąpienia innych procedur, które są jeszcze droższe lub niebezpieczne dla pacjenta. Z praktyki klinicznej wynika, że przypadki idiosynkrazji aspirynowej i alergii pokarmowej są tu najważniejszymi przykładami. Na obecnym etapie udowodnionych możliwości diagnostycznych tych testów należy jednak zaznaczyć, że każda z tych metod wymaga dopracowania tak, by w każdym laboratorium możliwe byłoby uzyskiwanie zadowalających wyników. Jednak wymaga to dalszych wysiłków optymalizujących dotychczasowe możliwości. Wydaje się, że podstawową trudnością jest stosowanie alergenów pokarmowych w odpowiedniej formule. Dodanie do zawiesiny komórkowej np. białek wchodzących w skład mleka może nie uwidoczniać rzeczywistego stanu uczulenia na ten pokarm, ze względu na to, że niektórych pacjentów uczulać mogą oligopeptydy powstające w przewodzie pokarmowym na skutek enzymatycznego trawienia. Zagadnienie to dotyczy również innych alergenów pokarmowych. Problem ten był od dawna poruszany przy okazji rozważań dotyczących niskiej czułości testów skórnych i testów do ilościowej oceny IgE przeciwko pokarmom. Analogiczne badania w zakresie idiosynkrazji aspirynowej natrafiają również na problemy, obecnie już nie w zakresie czułości, lecz swoistości osiąganych wyników. Zastanawia fakt stosowania bardzo dużych stężeń aspiryny i innych niesterydowych leków przeciwzapalnych do uwidocznienia pozytywnego (czasem fałszywie pozytywnego) wyniku. Stężenia te w przypadku aspiryny sięgają aż 1 mg/ml. Z drugiej strony, zmniejszenie tego stężenia

powoduje zmniejszenie czułości testu oceniającego ekspresję CD63 na powierzchni bazofoila. Równie frapujące jest pytanie, dlaczego grupa badaczy hiszpańskich zdecydowała się na badania z zastosowaniem kilku niesterydowych leków przeciwzapalnych, pomimo, że w testach *in vivo* stosuje się z powodzeniem wyłącznie aspirynę (3). Uzyskiwane wyniki dodatnie różnią się u poszczególnych pacjentów w kontekście użytych stężeń jak i poszczególnych leków. Wśród tych osób jedne reagują na stężenia wyższe a inne wyłącznie na niższe. Są osoby, które reagują np. na aspirynę, ale nie na diklofenak, ale są też i takie, które reagują na oba bodźce. Fakty te rodzą szereg ważnych pytań i wątpliwości

Piśmiennictwo

1. Buhmig H.J. i wsp.: The monoclonal antibody 97A6 defines a novel surface antigen expressed on human basophils and their multipotent and unipotent progenitors. *Blood* 1999,94,2343-56.
2. Cozon, G. i wsp.: Detection of activated basophils using flow cytometry for diagnosis in atopic patients. *Allergol Immunopathol (Madr)* 1999,27,182-7.
3. Gamboa P. i wsp.: The flow-cytometric determination of basophil activation induced aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) is useful for *in vitro* diagnosis of the NSAID hypersensitivity syndrome. *Clin Exp Allergy* 2004,34,1448-57.
4. Hauswirth A.W. i wsp.: Recombinant allergens promote expression of CD203c on basophils in sensitized individuals. *J Allergy Clin Immunol* 2002,110,102-9.
5. Kahlert H., Cromwell O., Fiebig H.: Measurement of basophil-activating capacity of grass pollen allergens, allergoids and hypoallergenic recombinant derivatives by flow cytometry using anti-CD203c. *Clin Exp Allergy* 2003,33,1266-72.
6. Kahlert H. i wsp.: Evaluation of the allergenicity of allergoids and hypoallergenic recombinant allergens using basophil activation by detection of CD203c. *Allergy* 2002,57 (suppl.73),58.
7. Knol, E.F. i wsp.: Monitoring human basophil activation via CD63 monoclonal antibody 435. *J Allergy Clin Immunol* 1991,88,328-38.
8. Małolepszy J. i wsp.: Oznaczanie całkowitego stężenia IgE i alergenowo swoistych IgE w surowicy. W: Standardy w Alergologii. Część I. Pod patronatem Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Alergologicznego. The UCB Institute of Allergy. 2003,29-34
9. Mędrala W. i wsp.: Comparative study between skin prick tests and TOP-CAST allergen leukocyte stimulation in diagnosis of allergic status. *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.* 1997,7,2,115-18.
10. Mędrala W. i wsp.: The influence of the first course of immunotherapy in patients with pollinosis on sulfidoleukotriene release from peripheral blood leukocytes. *Int. Rev. Allergol. Clin. Immunol.* 1999,5,1,13-16.
11. Mitre E. i wsp.: Parasite antigen driven basophils are a major source of IL-4 in human filarial infections. *J Immunol* 2004,172,2439-45.
12. Moneret-Vautrin D.A. i wsp.: Human basophil acti-

vation measured by CD63 expression and LTC4 release in IgE-mediated food allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999,82,33-40.

13. Monneret G. i wsp.: Detection of basophil activation by flow cytometry in patients with allergy to muscle-relaxant drugs. *Anesthesiology* 2000,92,275-7.

14. Paris-Kohler A. i wsp.: *In vitro* diagnosis of cypress pollen allergy by using cytofluorimetric analysis of basophils (Basotest). *J Allergy Clin Immunol* 2000,105,339-45.

15. Platz I.J. i wsp.: Hymenoptera-venom-induced upregulation of the basophil activation marker ecto-nucleotide pyrophosphatase /phosphodiesterase 3 in sensitized individuals. *Int Arch Allergy Immunol* 2001,126,335-42.

16. Sabbah A., Sainte-Laudy J.: Flow Cytometry applied to the analysis of Lymphocyte and Basophil activation. *ACI International* 1996,8/4,116-9.

17. Sainte-Laudy J. i wsp.: Analysis of anti-IgE and allergen induced human basophil activation by flow cytometry. Comparison with histamine release. *Inflamm Res* 1998,47,401-8.

18. Sainte-Laudy J. i wsp.: Analysis of membrane expression of the CD63 human basophil activation marker. Applications to allergologic diagnosis. *Allerg Immunol (Paris)* 1994,26,211-4.

19. Sainte-Laudy J. i wsp.: Diagnosis of venom allergy by flow cytometry. Correlation with clinical history, skin tests, specific IgE, histamine and leukotriene C4 release. *Clin Exp Allergy* 2000,30,1166-71.

20. Sanz M.L. i wsp.: Flow-cytometric cellular allergen stimulation test in latex allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 2003,130,33-9.

21. Sanz, M.L. i wsp.: Allergen-induced basophil activation: CD63 cell expression detected by flow cytometry in patients allergic to *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Lolium perenne*. *Clin Exp Allergy* 2001,31,1007-13.

22. Sanz M.L. i wsp.: Use of flow cytometry to assess basophil activation in patients allergic to betalactam antibiotics. Correlation between flow cytometric allergen stimulation test (FAST) and other *in vivo* and *in vitro* tests. *Int Arch Allergy Immunol* 2001,124,307-8.

23. Wolańczyk-Mędrala A. i wsp.: Allergen induced sulfidoleukotriene release from peripheral blood leukocytes in patients with different effectiveness of specific immunotherapy. *Int. Rev. Allergol. Clin. Immunol.* 2001,7,2,61-65.

w kwestii podstawowej – w jakim kierunku należy dążyć by osiągnąć zamierzony cel?

Wydaje się, że interesująca byłaby również próba połączenia tych testów i przeprowadzanie na przykład oceny ekspresji CD203c lub CD63 i jednoczesnej oceny wewnątrzkomórkowej syntezy IL-4, co dałoby możliwość określenia odsetka bazofofilów aktywowanych syntezujących jednocześnie interleukinę 4.

Pomijając rozważania dotyczące bieżących sukcesów i problemów charakteryzujących te metody należy podkreślić, że próbom tym towarzyszą bardzo duże oczekiwania w kontekście wykorzystania ich walorów w nieodległej przyszłości.

Wpłynęła: 20.01.2006

Adres: Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych i Alergologii, AM we Wrocławiu,
ul. Traugutta 57, 50-417 Wrocław