

Testy aktywacji bazofila metodą cytometrii przepływowowej w diagnostyce alergologicznej

Flowcytometric basophil activation test as a method of allergy diagnosis

lek. med. Alina Niwińska¹, lek. med. Anna Parużyńska¹, dr hab. n. med. Anna Wolańczyk-Mędrala^{1,2}

1. Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Geriatrii i Alergologii Akademii Medycznej we Wrocławiu

2. Zakład Badań Klinicznych, Wyższa Szkoła Medyczna w Legnicy

Streszczenie: Testy oparte na ocenie aktywacji bazofila z wykorzystaniem metod cytometrii przepływowowej są narzędziem coraz częściej wykorzystywanym w diagnostyce alergologicznej. Stanowią alternatywę dla powszechnie stosowanych metod w przypadku ich nieskuteczności lub braku możliwości wykonania badań *in vivo* ze względu na ryzyko zagrażających życiu odpowiedzi ogólnoustrojowych. Opracowanie optymalnej metody diagnostyki BAT wymaga rozważenia zalet i wad rozmaitych wariantów postępowania na każdym etapie testu.

Abstract: During recent years detection of allergen-induced basophil activation by flow cytometry has been shown to be reliable tool for *in vitro* diagnosis of immediate allergy. This method can provide additional information when another tests are risky or fail. The available technologies need still be optimized and standardized.

Słowa kluczowe: test aktywacji bazofila, BAT, FLOW-CAST, cytometria przepływowowa

Key words: Basophil Activation Test, BAT, FLOW-CAST, flow cytometry

Podstawą diagnostyki alergii IgE-zależnej jest prawidłowo zebrany wywiad, wsparty wynikami badań dodatkowych, takich jak punktowe testy skórne, testy śródskórne, i oznaczanie obecności IgE alergenowo swoistych. W niejasnych sytuacjach przeprowadza się próbę prowokacyjną z podejrzanym alergenem. Szczególny problem stanowi alergologia na leki. Część substancji, ze względu na miejscowe działanie drażniące, nie może zostać wykorzystana w testach skórnych, nie dysponujemy zestawami do oznaczeń IgE swoistych dla większości leków, a także dla części innych alergenów. Zagrażające życiu odpowiedzi ogólnoustrojowe powodują, że u niektórych chorych próby prowokacyjne, a nawet testy skórne, są niebezpieczne. Poszukuje się więc metod diagnostycznych, które byłyby możliwie najmniej obciążające dla

pacjenta i odtwarzałyby możliwie najwierniej procesy zachodzące w uczulonym ustroju, korelowałyby z odpowiedzią *in vivo* i dawały możliwie jednoznaczne odpowiedzi na postawione pytania kliniczne. Testy aktywacji bazofila (BAT) pod wpływem stymulacji swoistym alergenem z wykorzystaniem cytometrii przepływowowej wydają się w znacznej mierze spełniać te wymagania. Podstawowymi komórkami efektorowymi w zapaleniu alergicznym są obecne w tkankach, a więc trudniej dostępne badaniu, komórki tuczne (mastocyty) oraz bazofile (granulocyty zasadochłonne), których rola przez długi czas nie była doceniana. Stanowią one 0,2–1% leukocytów krwi obwodowej i początkowo uważano je za formę mastocytów [1–3]. Cechą charakterystyczną mastocytów i bazofilów, odpowiedzialną za ich rolę w odpowiedzi alergicznej,

są znajdujące się na ich błonie komórkowej receptory o wysokim powinowactwie do immunoglobulin E (FcεRI). Przyłączanie przez ten receptor fragmentu Fc przeciwciała IgE i następowe związanie cząsteczek alergenu lub przeciwciał skierowanych przeciw IgE albo FcεRI powoduje aktywację komórki i uwolnienie prozapalnych mediatorów, zarówno preformowanych, zgromadzonych w ziarnistościach wydzielniczych (amin biogennych, enzymów), jak i syntetyzowanych de novo (prostaglandyn, leukotrienów) oraz cytokin i czynników wzrostu [1, 3, 4]. Degranulacja ziarnistości może zachodzić gwałtownie, w wyniku egzocytozy, z dużymi zmianami morfologicznymi komórki, lub stopniowo. Aktywacja zmienia również ekspresję szeregu białek na powierzchni błony komórkowej, m.in. CD63 i CD203c [2, 4, 5].

Do aktywacji bazofilów dochodzi również w mechanizmach niezależnych od receptora FcεRI. W ten sposób działają składniki układu dopełniacza – C3a i C5a, peptydy bakteryjne takie jak fMLP (formylo-metionyl-leucyl-fenylalanina) i inne małe peptydy, składniki kontrastów, promieniowanie rentgenowskie. Pod ich wpływem dochodzi do uwalniania histaminy i, w mniejszym stopniu, produkcji cytokin [5, 6].

IgE-zależna aktywacja bazofila cechuje się dużymi różnicami osobniczymi, a nawet między bazofilami jednej osoby. Różnice wynikają z odmiennych gęstości receptorów FcεRI na powierzchni komórek, stężenia sIgE oraz całkowitej IgE, wrażliwości i reaktywności bazofila, obecności swoistej dla alergenu IgG, stanu hormonalnego pacjenta i przyjmowanych leków. Nawet do 25% osób może nie uwalniać histaminy po stymulacji anty-IgE (mniej przy stymulacji monoklonalnymi przeciwciałami anty-FcεRI), a około 10% nie wykazywać markerów aktywacji [2, 4]. Część bazofilów występuje w stanie pobudzenia na skutek działania mechanizmów niezależnych od wiązania alergenu przez błonowe IgE. Niedawny kontakt z alergenem przeważnie zwiększa ich odsetek. Innymi przyczynami wysokiego podstawowego poziomu aktywacji są zanieczyszczenia odczynników pirogenami, endotoksynami, substancjami, z jakich wykonany jest sprzęt laboratoryjny, a nawet heparyną [4].

Jednym z pierwszych testów komórkowych jest opracowany w latach 60. ubiegłego wieku test uwalniania histaminy z bazofilów. Polega on na oznaczaniu metodą ELISA z odczytem spektrofotometrycznym ilości histaminy uwolnionej po inkubacji leukocytów z alergenami, po inkubacji bez alergenów oraz całkowitej ilości histaminy w komórkach. Wynik przedstawiany jest jako procent uwolnionej histaminy (z uwzględnieniem spontanicznego uwalniania tego mediatora).

Zaletami tej metody są brak konieczności izolacji komórek (oznaczenie w krwi pełnej) i prostota oznaczenia stężenia histaminy. Niestety, nie jest ona wystarczająco czuła i specyficzna dla alergenów pokarmowych, leków i jądów owadów. Ponadto z powodu znacznych różnic osobniczych uzyskanie wiarygodnego wyniku wymaga zastosowania kilku stężeń alergenu.

Nowszym testem jest CAST-ELISA opierający się na oznaczaniu ilości uwolnionego leukotrienu C4 [6]. Technika wykonania tego testu jest zbliżona do wykonania testu uwalniania histaminy, a uwolnione leukotrieny są ilościowo mierzone techniką ELISA.

Testy aktywacji bazofilów BAT oparte na pomiarach cytometrycznych polegają na inkubacji komórek (z krwi pełnej heparynizowanej lub pobranej na EDTA) z alergenem, a następnie na ocenie ich aktywacji na podstawie zmiany odsetka komórek wykazujących ekspresję wybranych białek błonowych identyfikowanych za pomocą przeciwciał sprzężonych z fluorochromem w porównaniu z komórkami inkubowanymi bez alergenu (kontrola ujemna) i przy udziale substancji aktywującej bazofile w sposób nieswoisty (np. przeciwciała anty-IgE, fMLP). Ustalenie odpowiedniego punktu odcięcia pozwala na odpowiednio czułą i specyficzną identyfikację osób uczulonych na dany alergen [7].

Cytometria przepływowa jest metodą umożliwiającą identyfikację i liczenie komórek, pomiar ich wielkości, ziarnistości i fluorescencji nawet przy ich niewielkiej liczebności. Komórki zawieszane w buforze przepływają pojedynczo (dzięki ogniskowaniu hydrodynamicznemu) przez strefę pomiaru, gdzie oświetlane są wiązką laserową. Światło jest rozpraszane, odbijane, załamywane i absorbowane przez komórki, zależnie od ich wielkości i budowy wewnętrznej (np. ziarnistości). Jego pomiar przez detektor przedni (FSC, *forward scatter channel*) oraz ustawiony prostopadle do niego detektor boczny (SSC, *side scatter channel*) pozwala ocenić wielkość (FSC) oraz budowę wewnętrzną komórek (SSC). Cytometry mają dodatkowe układy rejestrujące ustawione pod różnymi kątami w stosunku do wiązki światła. Możliwy jest również pomiar fluorescencji komórek znakowanych fluorochromami (najczęściej fikoerytryną PE) lub izotiocyanianem (FITC), związanych z przeciwciałami identyfikującymi odpowiednie markery błonowe. Zależnie od rodzaju aparatu można mierzyć (po odpowiednim filtrowaniu wzbudzonego światła) w oddzielnych kanałach kilka rodzajów fluorescencji. Proces pomiaru zachodzi z prędkością od kilkuset do kilku tysięcy komórek na sekundę. Cytometria przepływowa eliminuje konieczność pełnej izolacji komórek, co

w przypadku bazofilów jest procesem trudnym i czasochłonnym [2, 4–6, 8].

Opracowując optymalną metodę diagnostyki BAT, należy rozpatrzyć kilka metod postępowania na każdym etapie testu, począwszy od sposobu pobrania krwi do oznaczeń.

Obecnie powszechnie stosowane są dwa podstawowe testy: Basotest i FLOW-CAST oraz jego modyfikacja, których wyniki, mimo odmienności procedur, są zbliżone. Basotest wykonywany jest na krwi pełnej, heparynizowanej. Jest to metoda nieco szybsza i prostsza, a bazofile aktywowane są w środowisku najbardziej zbliżonym do naturalnego. Wadą jest nieco mniejsza czułość od FLOW-CAST przy aktywacji alergenowej i przeciwciałami anti-IgE, co nie ma wpływu na rozpoznanie w przypadku alergenów dających duży wzrost odsetka komórek aktywnych, ale może mieć wpływ na wyniki w diagnostyce alergii na leki (np. antybiotyki beta-laktamowe). FLOW-CAST wymaga uzyskania przez odwirowanie osocza bogatokomórkowego, które odwirowuje się ponownie i odlewa górną warstwę. Tak wyizolowane komórki, stanowiące masę leukocytarną, zawieszają się w buforze stymulacyjnym i inkubuje z: roztworem badanego alergenu, buforem stymulacyjnym w celu określenia stopnia spontanicznej aktywacji i przeciwciałami anti-FcεRI lub inną substancją aktywującą nieswoiście bazofile, dla określenia ich reaktywności [4, 5, 7–9]. Modyfikacja tego testu (FLOW2 CAST), polegająca na dodaniu przeciwciał znakujących już na początku stymulacji oraz skróceniu czasu stymulacji z 30 do 15 minut, pozwala na uzyskanie wyniku już w ciągu jednej godziny, bez zmniejszenia stopnia czułości i specyficzności oznaczeń. Ważnym i nowym elementem tego testu jest wprowadzenie przeciwciała identyfikującego bazofile skierowanego przeciwko cząstce CCR3 [9].

Bazofile we krwi pobranej na EDTA, przechowywanej w temperaturze 4°C, zachowują pełną żywotność do 24 godzin, a dla krwi heparynizowanej czas ten jest krótszy. Dłuższy czas przechowywania zwiększa liczbę wyników fałszywie ujemnych [4].

Granulocyty zasadochłonne identyfikuje się w badaniu cytometrycznym na podstawie wielkości, obecności ziarnistości i białek błonowych charakterystycznych dla tej grupy leukocytów, wykrywanych przez znakowanie swoistymi dla białek błonowych przeciwciałami związanymi z cząsteczką fluorochromu. Polega to na bramkowaniu na wykresie sygnału rejestrowanego przez detektor boczny SSC wobec sygnału pochodzącego ze znacznika fluorescencyjnego (np. FL1) populacji komórek znakowanych fluorochromem związanym np. z przeciwciałem anti-

-IgE i o niskim sygnale SSC charakterystycznym dla limfocytów i bazofilów. W następnym etapie analizy zabramkowane bazofile ocenia się pod względem ekspresji wybranego markera aktywacji, np. CD63, wykorzystując wykres sygnału z pierwszego znacznika wobec sygnału z drugiego znacznika (FL1 wobec FL2). W celu odróżnienia bazofilów od innych komórek najczęściej stosowano przeciwciała anti-IgE. Inne możliwości to: anti-IgE/CD203c, anti-CD45 (powszechny antygen leukocytów) + anti-FcεRI, anti-CCR3, anti-CD45 + anti-CCR3, anti-CD123 (receptor IL3 obecny na powierzchni bazofilów i innych leukocytów) + anti-HLA-DR (wykluczenie monocytów i komórek prezentujących antygen) lub anti-CRTH2 (receptor chemoatraktantów/receptor prostaglandyny D2) + anti-CD3 (wyłączenie limfocytów T) [1, 2, 9–13]. Liczba zidentyfikowanych bazofilów wpływa na czułość badania, choć dla od 100 do 1000 zarejestrowanych bazofilów odsetek aktywowanych komórek ulega na ogół małym zmianom, jednak większa liczba bazofilów przyczynia się do zmniejszenia współczynnika zmienności, czyli podwyższenia powtarzalności wyniku. Wybór optymalnej metody identyfikacji granulocytów zasadochłonnych wymaga dalszych badań.

Kolejnym problemem jest wybór odpowiedniego alergenu do testu komórkowego. Użyta cząsteczka alergenu musi nie tylko być rozpoznawana przez swoiste przeciwciała, lecz także spełniać szereg innych wymogów. Aktywacja komórek efektorowych wymaga przeważnie obecności co najmniej dwóch epitopów w cząsteczce alergenu, ich budowa i odległość mogą wpływać na stopień odpowiedzi komórkowej. Na aktywację komórek efektorowych wpływa więc budowa i struktura alergenu, liczba epitopów, co determinuje rodzaj kompleksu tworzonego z przeciwciałami IgE. Większość leków jest haptenami, wymagającymi dla wywołania odpowiedzi immunologicznej związania z białkiem nośnikowym. Alergen nie może wywoływać nieswoistej stymulacji komórek, niezależnej od IgE (np. endotoksyny), ani mieć działania cytotoksycznego (jady owadów błonkoskrzydłych). Ze względu na różnice osobnicze niemożliwe jest uzyskanie wiarygodnego wyniku przy użyciu jednego rozcieńczenia alergenu, choć zwykle wystarczają 2–3 rozcieńczenia, dla objęcia większości przypadków [4].

Białka błonowe, ze względu na łatwą dostępność obserwacji, stały się przedmiotem licznych badań aktywacji granulocytów zasadochłonnych. Spośród powierzchniowych białek bazofilów wytypowano te, które nie występują lub ich ekspresja jest niska na komórkach w stanie spoczynku, a w stanie aktywacji ujawniają się lub rośnie ich ekspresja. Kolejnym

etapem było wyselekcjonowanie tych cząsteczek, które są swoiste dla bazofilów lub występują na powierzchni komórek łatwych do odróżnienia w cytometrii przepływowej od populacji bazofilów. W zakresie ekspresji białek błonowych zaobserwowano dwa główne profile aktywacji. Do jednej grupy można zaliczyć białka, których ekspresja zwiększa się gwałtownie po stymulacji i osiąga maksimum po 5–15 min (grupa szybkiej odpowiedzi: CD203c, CD13, CD164), do drugiej grupy białka o ekspresji osiągającej maksimum po 20–40 min (grupa wolnej odpowiedzi: CD63, CD107a) [14]. Białko CD63 w bazofilach spoczynkowych występuje w błonie ziarnistości wydzielniczych [1, 15]. Wraz z degranulacją komórki jest ekspozowane na powierzchni błony komórkowej, a jego ekspresja koreluje z wydzielaniem histaminy, zarówno pod wpływem stymulacji anty-IgE, jak i fMLP, a przy supraoptymalnej stymulacji z anty-IgE ekspresja tego markera może jeszcze wzrastać, w przeciwieństwie do wydzielania histaminy. Ze względu na występowanie CD63 także na płytkach krwi istniały obawy, że część komórek identyfikowanych jako bazofile CD63+ stanowią bazofile opłaszczane przez płytki. Zjawisko to nie zachodzi w znaczącej skali oraz dotyczy w takim samym stopniu zarówno próbek aktywowanych, jak i kontroli ujemnej, więc nie powinno istotnie wpływać na czułość metody, a pobranie krwi na EDTA redukuje zanieczyszczenie płytkami. Ekspresja CD63 koreluje zarówno z degranulacją komórek, jak i z ekspresją CD107c. Białka te zlokalizowane są prawdopodobnie w tych samych ziarnistościach wydzielniczych [2, 11, 14, 16].

CD203c jest swoisty dla bazofilów i ich komórek progenitorowych. Na nieaktywnych komórkach odznacza się niską ekspresją, która znacznie wzrasta po aktywacji, niezależnie od przebiegu procesu degranulacji komórki. Spośród trzech zidentyfikowanych epitopów CD164, epitop klasy trzeciej (glikozydazoopornej) występuje na wszystkich bazofilach, a jego ekspresja znacząco rośnie w wyniku aktywacji, natomiast epitop klasy drugiej (N-glikozydazo-wrażliwej) obserwowany jest jedynie na komórkach aktywowanych. Ekspresja BSP-1 (*basophil specific protein*) po aktywacji niemal zupełnie znika, prawdopodobnie dochodzi do jego redystrybucji w procesie endocytozy, a następnie jego ekspresja ponownie wzrasta po kilkudziesięciu minutach. Sprawą otwartą pozostaje zwiększenie czułości oznaczeń przez dodanie IL3 do buforu stymulującego. Cytokina ta wzmacnia ekspresję CD63 indukowaną alergenem i anty-IgE oraz spoczynkową ekspresję CD203c, co osłabia ekspresję CD203c w komórkach stymulowanych lub nie wpływa na nią [2, 16].

BAT wykorzystywany może być również w badaniach nadwrażliwości na niesteroidowe leki przeciwzapalne. Aktywacja bazofilów w tym przypadku nie przebiega w mechanizmie IgE-zależnym, ale jest wynikiem inhibicji cyklooksygenazy typu 1 (COX-1), prowadzącej do zmniejszenia wytwarzania PGE₂, która hamuje aktywację bazofilów [4, 17].

Testy aktywacji bazofila, niezależnie od użytego protokołu, wnoszą użyteczne informacje o odpowiedzi immunologicznej na swoisty alergen i stają się narzędziem coraz szerzej wykorzystywanym w diagnostyce alergologicznej wybranych pacjentów. BAT zwiększa odsetek prawidłowych rozpoznań w sytuacjach, gdy inne testy dają niejednoznaczne wyniki. Jest cennym testem *in vitro* i w związku z tym pozwala na uniknięcie narażenia osoby uczulonej na kontakt z alergenem, mogący skutkować występowaniem ciężkich reakcji ogólnoustrojowych. Dalsza optymalizacja i standaryzacja stosowanych metod wydaje się jedynie kwestią nieodległego czasu [2, 4, 18, 19].

Piśmiennictwo:

1. Sanz M.L., Sanchez G., Gamboa P.M. et al.: Allergen-induced basophil activation: CD63 cell expression detected by flow cytometry in patients allergic to *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Lolium perenne*. *Clin. Exp. Allergy* 2003, 33: 1266-1272.
2. Boumiza R., Debard A.L., Monneret G.: The basophil activation test by flow cytometry: recent developments in clinical studies, standardization and emerging perspectives. *Clin. Mol. Allergy* 2005, 30: 9.
3. Sanz M.L., Gamboa P.M., Antépara I. et al.: Flow cytometric basophil activation test by detection of CD63 expression in patients with immediate-type reactions to beta-lactam antibiotics. *Clin. Exp. Allergy* 2002, 32: 277-286.
4. De Weck A.L., Sanz M.L., Gamboa P.M. et al.: Diagnostic tests based on human basophils: more potentials and perspectives than pitfalls. II. Technical issues. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 2008, 18: 143-155.
5. Paris-Köhler A., Demoly P., Persi L. et al.: In vitro diagnosis of cypress pollen allergy by using cytofluorimetric analysis of basophils (Basotest). *J. Allergy Clin. Immunol.* 2000, 105: 339-345.
6. Mędrala W., Malolepszy J., Wolańczyk-Mędrala A. et al.: CAST-ELISA test – A new diagnostic tool in pollen allergy. *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.* 1997, 7: 32-35.
7. Potapińska O., Demkow U., Wąsik M. et al.: Cytometryczna ocena aktywacji bazofilów w diagnostyce chorób alergicznych. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2009, 77: 152-158.

8. Hennesdorf F, Florian S, Jakob A. et al.: Identification of CD13, CD107a, and CD164 as novel basophil-activation markers and dissection of two response patterns in time kinetics of IgE-dependent upregulation. *Cell Res.* 2005, 15: 325-335.
9. Wolańczyk-Mędrala A., Gogolewski G., Liebhart J. et al.: A New Variant of the Basophil CD63 Upregulation. The Effect of Cetirizine. *J. Investig Allergol. Clin. Immunol.* 2009, 19: 465-473.
10. Ebo D.G., Hagedorens M.M., Bridts C.H. et al.: Hymenoptera Venom Allergy: Taking the Sting Out of Difficult Case. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 2007, 17: 357-360.
11. Sainte-Laudy J., Boumediene A., Touraine F. et al.: Use of both CD63 up regulation and IgE down regulation for the flow cytometric analysis of allergen induced basophil activation. Definition of an activation index. *Inflamm. Res.* 2007, 56: 291-296.
12. Ebo D.G., Hagedorens M.M., Schuerwegh A.J. et al.: Flow-Assisted Quantification of In Vitro Activated Basophils in the Diagnosis of Wasp Venom Allergy and Follow-up of Wasp Venom Immunotherapy. *Clin. Cytometry* 2007, 72B: 196-203.
13. Monneret G., Benoit Y., Debard A.L. et al.: Monitoring of basophil activation using CD63 and CCR3 in allergy to muscle relaxant drugs. *Clin. Immunol.* 2002, 102: 192-199.
14. Hennesdorf F, Florian S, Jakob A. et al.: Identification of CD13, CD107a, and CD164 as novel basophil-activation markers and dissection of two response patterns in time kinetics of IgE-dependent Upregulation. *Cell Res.* 2005, 15: 325-335.
15. Moneret-Vautrin D.A., Sainte-Laudy J., Kanny G. et al.: Human basophil activation measured by CD63 expression and LTC4 release in IgE-mediated food allergy. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 1999, 82: 33-40.
16. Abuaf N., Rostane H., Rajoely B. et al.: Comparison of two basophil activation markers CD63 and CD203c in the diagnosis of amoxicillin allergy. *Clin. Exp. Allergy* 2008, 38: 921-928.
17. Gamboa P.M., Sanz M.L., Caballero M.R. et al.: Use of CD63 expression as a marker of in vitro basophil activation and leukotriene determination in metamizol allergic patients. *Allergy* 2003, 58: 312-317.
18. González-Muñoz M., Villota J., Moneo I.: Analysis of basophil activation by flow cytometry in pediatric house dust mite allergy. *Pediatr. Allergy Immunol.* 2008, 19: 342-347.
19. Scherer K., Weber J.M., Jermann T.M. et al.: Cellular in vitro assays in the diagnosis of Hymenoptera venom allergy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2008, 146: 122-132.

Adres do korespondencji:

dr hab. n. med. Anna Wolańczyk-Mędrala
 Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Geriatrii
 i Alergologii Akademii Medycznej we Wrocławiu
 50-417 Wrocław, ul. Traugutta 57
 tel.: (71) 733-24-15, fax: (71) 733-24-09
 e-mail: annawolanczyk@gazeta.pl