

ДИАГНОСТИКА ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ЛЕКАРСТВЕННЫМ СРЕДСТВАМ С ПОМОЩЬЮ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛУОРИМЕТРИИ

Пичугина Л.В.,

Менеджер по продукции ЗАО «БиоХимМак Диагностика»

Согласно определению ВОЗ нестандартной реакцией на лекарственное вещество является повышенная чувствительность организма на введение терапевтических или меньших доз препарата, выражающаяся в развитии патологических эффектов. Среди нестандартных реакций на лекарственные средства выделяют: тип А (augmented reaction) — предсказуемые побочные эффекты, которые могут возникнуть у любого индивидуума; тип В (“bizarre”, странные) — непредсказуемые реакции, обусловленные индивидуальной чувствительностью (гиперчувствительностью) пациента, тип С (chronic, хроническое действие) — подавление адреналовой системы длительным приемом кортикостероидов, тип D (delayed, замедленного действия) — тератогенный или канцерогенный эффекты. К реакциям типа А относится 80% всех нестандартных эффектов, перечень этих реакций, как правило, приведен в инструкции по применению препарата. Примерно 13% реакций можно классифицировать как тип В, которые по механизму развития могут быть как неиммунологические (непереносимость, например, аспирина, псевдоаллергия вследствие прямой дегрануляции тучных клеток, в т.ч. под действием радиоcontrastной среды), так и иммунологические. Согласно номенклатуре Всемирной Организации Аллергии, термин «лекарственная аллергия» применяют к ситуациям, когда нестандартная реакция на лекарственное средство имеет иммунологическое происхождение. Термины «немедленного» или «замедленного» типа используют для описания симптомов и возможного механизма развития (опосредованные IgE, Т-клетками или IgG). Диагностика аллергий традиционно основана на анамнезе заболевания, положительных кожных тестах, которые остаются золотым стандартом диагностики аллергических состояний, и, если возможно, детекции специфического IgE. В большинстве случаев этот набор исследований позволяет поставить диагноз и идентифицировать аллерген. Однако, кожные тесты противопоказаны пациентам с эпизодами угрожающей жизни анафилаксии в анамнезе, а также нередки случаи противоречия между клиническими и лабораторными данными.

Диагностика аллергии к лекарственным средствам осложняется тем, что коммерческие тест-системы для определения специфического IgE доступны далеко не для всех лекарств, а кожные тесты часто могут давать ложно-положительные результаты за счет прямого раздражающего действия препаратов. В таких случаях требуется дополнительный тест *in vitro*.

Тестов *in vitro* для диагностики лекарственной аллергии немного. Эти тесты включают обнаружение специфического IgE, специфических Т-лимфоцитов и оценку высвобождения медиаторов из активированных клеток. Детекция специфического IgE в сыворотке осуществляют с помощью радиоаллергосорбентного и иммуноферментного методов. Специфические Т-лимфоциты выявляют в тесте бласттрансформации Т-лимфоцитов под действием лекарств, что может быть информативно при реакциях замедленного типа, но этот тест практически не востребован в клинике, а используется для научных исследований.

В тесте высвобождения медиаторов из активированных клеток оценивают выброс гистамина или лейкотриенов под действием аллергена. Существенными недостатками этих тестов являются: не всегда пригодные для анализа лекарственные антигены, так как гаптенные детерминанты большинства лекарств не известны, и, в некоторых случаях, плохая корреляция с клиническими данными. В основном такие тесты имеют ценность только для IgE-опосредованных реакций, включая анафилаксию.

Базофилы вместе с тучными клетками являются первичными эффекторами IgE-опосредованных и IgE-независимых заболеваний. При поступлении аллергена в сенсibilизированный организм он достигает мест сосредоточения тучных клеток, фиксировавших специфичные к нему IgE-антитела, и, связываясь с ними, вызывает активацию и дегрануляцию тучных клеток. В результате высвобождается большое количество ферментов, медиаторов воспаления, хемокинов — факторов для привлечения других эффекторных клеток, в частности, базофилов, которые, в свою очередь, дегранулируют под действием коктейля активирующих веществ. При действии гистаминвысвобождающих агентов наблюдается IgE-независимая активация эффекторных клеток. Так, под действием миорелаксантов, ванкомицина, ципрофлоксацина, пентамидина, радиоконтрастных препаратов, аспирина, ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента и других лекарственных препаратов может наблюдаться дегрануляция базофилов и тучных клеток. Именно поэтому базофилы являются перспективным объектом для исследования при диагностике нестандартных реакций на лекарства.

С появлением технологии проточной цитофлуориметрии, которая позволяет анализировать редкие популяции клеток периферической крови, такие как базофилы, диагностика аллергии приобрела дополнительные возможности. Ценность этого метода в том, что он позволяет обнаружить как IgE-зависимые, так и IgE-независимые реакции на препарат.

Проточная цитофлуориметрия в исследовании дегрануляции базофилов

Тест активации базофилов (ТАБ) методом проточной цитофлуориметрии для изучения активации базофилов был предложен недавно. ТАБ имитирует ситуацию контакта аллергена с клетками крови и позволяет зафиксировать изменения, провоцируемые аллергеном.

Принцип метода — выделенные лейкоциты или цельную кровь пациента инкубируют в присутствии изучаемого аллергена и Ко-стимулирующих (праймирующих) факторов — ИЛ3, гепарин, C5a в течение 15-30 минут; останавливают реакцию; клетки окрашивают специфическими антителами, затем анализируют на проточном цитофлуориметре. Используют как минимум 2 контроля: негативный, где клетки инкубируют только в присутствии праймирующего фактора, и позитивный в котором базофилы активируют антителами к IgE или его рецептору или синтетическим стимулятором fMLP.

При цитометрическом анализе ТАБ необходимо решить две проблемы: идентифицировать популяцию базофилов и зарегистрировать факт активации клеток. Для идентификации базофилов используют различные антитела, такие как анти-IgE, антиCD123 (рецептор ИЛ-3), анти-CCR3, анти-CRTH2, анти-CD45. Иногда используют дополнительные маркеры

для исключения других клеток, которые могут экспрессировать перечисленные молекулы. Например, CD3 — для исключения Th2, которые также как и базофилы экспрессируют рецептор простагландина D2 CRTH2 или HLA-DR, т.к. базофилы негативны по этой молекуле. Для подтверждения факта активации базофилов исследуют степень поверхностной экспрессии некоторых молекул. Описано увеличение экспрессии CD45, CD11b и CD11c на базофилах при активации *in vitro* и снижение CD62L и интенсивности флуоресценции базофилов, несущих IgE. В настоящее время в качестве маркеров активации все чаще используют маркер дегрануляции CD63 и активационную молекулу CD203c; идут разработки использования CD13, CD164 и CD107a.

CD63 — белок с молекулярной массой 53 kDa, экспрессируется не только базофилами, но и моноцитами, макрофагами и тромбоцитами. Экспрессия этого маркера хорошо коррелирует с дегрануляцией и высвобождением гистамина, поэтому CD63 считается классическим маркером дегрануляции базофилов. Эта молекула расположена на мембране базофильных гранул и при дегрануляции в результате слияния гранул с цитоплазматической мембраной оказывается на поверхности клетки. При активации базофилов экспрессия CD63 увеличивается на 100% (Рисунок 1).

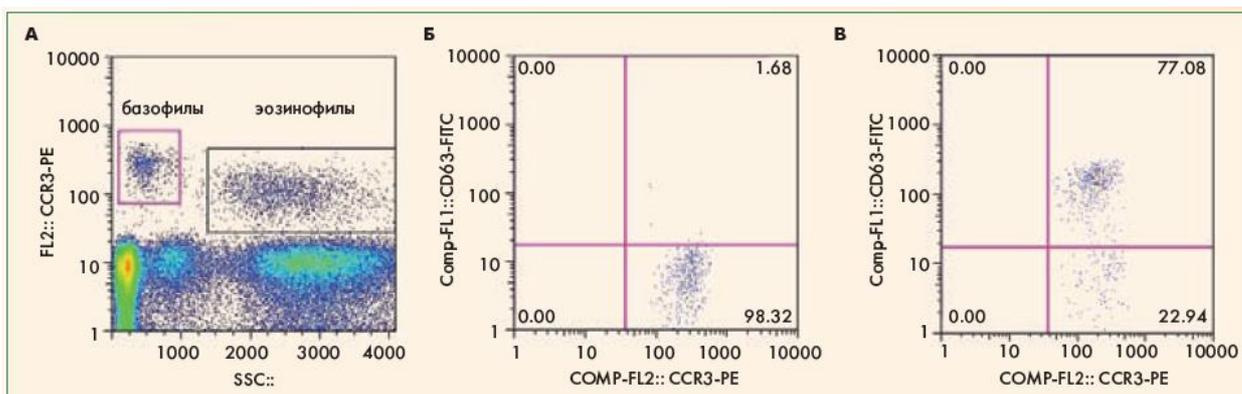


Рисунок 1. Тест активации базофилов с использованием антител к CCR3 (маркеру базофилов и эозинофилов) и CD63 (Flow2-CAST, Buhlmann Laboratory). А – Выделение региона базофилов по экспрессии хемокинового рецептора CCR3, эозинофилы исключают из анализа как события с более высокими значениями бокового светорассеяния (SSC); далее анализ региона базофилов по степени экспрессии CD63: Б – негативный контроль; В – положительный контроль (стимуляция fMLP).

Диагностическая ценность ТАБ с использованием CD63 была подтверждена многими исследованиями. Было клинически обосновано применение ТАБ для диагностики аллергии к ингаляционным аллергенам, ядам насекомых, латексу, миорелаксантам, беталактамным антибиотикам, пиразолонам и нестероидным противовоспалительным средствам.

Ведутся разработки использования теста для мониторинга антиген-специфической иммунотерапии, диагностики пищевой аллергии и хронической крапивницы. CD203c — молекула более специфичная для базофилов, чем CD63, однако на данный момент это гораздо менее исследованный маркер активации базофилов.

CD203c представляет собой мультифункциональный фермент, участвующий в расщеплении ряда молекул, включающих дезоксирибонуклеотиды и нуклеотидные сахара. Маркер экспрессируется на базофилах и тучных клетках. На других популяциях лейкоцитов эта молекула не обнаружена. После активации базофилов уровень экспрессии CD203c значительно возрастает (примерно на 350%) (Рисунок 2).

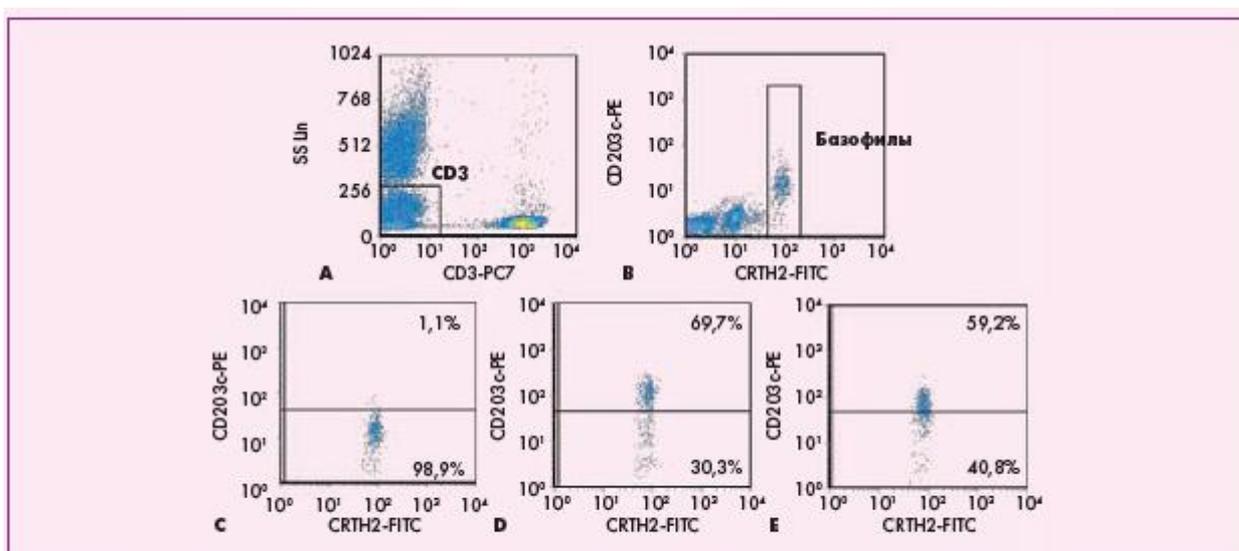


Рисунок 2. Тест активации базофилов с использованием антител к CD3, CD203c и CRTH2 (Allergenicity Kit, Beckman Coulter). А — исключение из анализа CD3+ лимфоцитов, т.к. Th2 также экспрессируют CRTH2; В — выделение региона базофилов среди CD3-негативных событий по экспрессии CRTH2; далее анализ региона базофилов по степени экспрессии CD203c: С — негативный контроль, D — положительный контроль (стимуляция fMLP), E — стимуляция метамизолом натрия.

Показано, что ТАБ с использованием CD203c и CD63 имеют различную чувствительность для разных аллергенов. Есть данные, что при постановке ТАБ на амоксициллин с использованием CD203c вместо CD63 чувствительность метода повышается, а для миорелаксантов, напротив, предпочтительней использовать CD63.

В настоящее время исследователи используют различные протоколы постановки ТАБ: используют цельную кровь или выделенные базофилы, гепарин или ЭДТА в качестве антикоагулянта и т.д. Показано, что значимое влияние на результат ТАБ оказывают несколько факторов: длительность хранения крови перед постановкой, выбор маркера для выделения популяции базофилов, концентрация праймирующего агента (ИЛ-3), чувствительность проточного цитофлуориметра, длительность интервала между эпизодом развития нестандартной реакции и постановкой теста.

Тест активации базофилов, согласно публикациям последних лет, становится основным в аллергодиагностике и, особенно, в диагностике повышенной чувствительности к лекарственным средствам. Сегодня несколько производителей предлагают готовые коммерческие тест-системы, разработанные с учетом всех тонкостей постановки ТАБ, которые позволяют исследователю избежать ненужных вариаций постановки и использовать данный тест и для научных исследований и для диагностики IgE-опосредованных и IgE-независимых заболеваний.

Компания Buhlmann Laboratory AG (Швейцария) предлагает набор для постановки ТАБ Flow2 CAST®. Это новая разработка компании, которая позволяет проводить постановку на клетках цельной крови и анализ дегрануляции базофилов по степени экспрессии CD63. Buhlmann Laboratory AG предлагает также большой ассортимент аллергенов.

Компания Beckman Coulter, крупный производитель реагентов и оборудования для проточной цитофлуориметрии, выпустила набор Allergenicity Kit®, предназначенный для постановки ТАБ на клетках цельной крови. Набор содержит все необходимые для постановки реагенты. Анализ активации базофилов проводят по степени экспрессии специфического маркера базофилов CD203c.

