

Olga Potapińska¹, Elżbieta Górka¹, Anna Zawadzka-Krajewska², Marek Kulus²,
Maria Wąsik¹, Urszula Demkow¹

¹Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej i Immunologii Klinicznej Wieku Rozwojowego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik: prof. dr hab. med. M. Wąsik

²Klinika Pneumonologii i Alergologii Wieku Dziecięcego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik: prof. dr hab. med. M. Kulus

Przydatność oznaczania antygenu CD203c w ocenie aktywacji bazofilów pod wpływem antygenów pyłków traw i *Dermatophagoides pteronyssinus*. Badania wstępne

The usefulness of CD203c expression measurement on basophils after activation with grass pollen and *Dermatophagoides pteronyssinus* antigens. Preliminary study

Abstract

Introduction: 'Gold standard' in the diagnosis of atopic disease are skin prick tests and specific IgE evaluation. Well-established *in vitro* tests, such as the histamine release test, the leukotriens release test and the flow cytometric basophil activation test can be very helpful in diagnostics, especially when the skin prick test is contraindicated.

The aim of this study was to evaluate the usefulness of antigen CD203c expression, as a marker of basophil activation by grass pollen or *D. pteronyssinus* antigens.

Material and methods: Peripheral blood from 13 allergic patients and nine healthy volunteers was analysed. Basophils activation was measured by the breakdown of antigen CD203c expression with Allergenicity Kit (Beckman Coulter), using Cytomics FC 500 flow cytometer (Beckman Coulter).

Results: The sensitivity was 92,3% and specificity of test was 100%. $50.95 \pm 15.7\%$ of basophils (median 49.7%, 1.91–72.42%) were activated after grass pollen stimulation in atopic patients sensitised to this allergen, in comparison to 1.91% (0.00–7.96%) in control patients ($p = 0.002$). The percentage of activated basophils after *D. pteronyssinus* antigens stimulation was $40.6 \pm 25.2\%$ in allergic patients, compared to only $2.51 \pm 1.96\%$ of basophils from non-atopic controls ($p = 0.0003$). Basophils from 21 patients responded after anti-IgE stimulation ($44.1 \pm 18.9\%$), and none of the analysed samples was activated after PBS stimulation ($2.03 \pm 1.19\%$, $p < 0.0001$).

Conclusions: These results demonstrate that basophil activation test based on antigen CD203c expression is very accurate in the diagnosis of atopic diseases.

Key words: CD203c, basophils, atopic disease, grass pollen, *D. pteronyssinus*

Pneumonol. Alergol. Pol. 2009; 77: 138–144

Streszczenie

Wstęp: „Złotym standardem” w diagnostyce chorób atopowych są testy skórne i oznaczanie poziomu swoistego IgE. Obecnie możliwa jest również cytometryczna ocena aktywacji bazofilów jako komórek efektorowych w reakcjach atopowych. Celem pracy była ocena przydatności testu *in vitro* wykorzystującego ekspresję CD203c jako markera aktywacji bazofilów w diagnostyce atopii.

Adres do korespondencji: mgr Olga Potapińska, ul. Marszałkowska 24, 00–576 Warszawa, tel./faks: (022) 629 65 17, e-mail: olga.potapinska@wum.edu.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 26.06.2008 r.

Copyright © 2009 Via Medica

ISSN 0867–7077

Materiał i metody: Przebadano 22 osoby, w tym 13 chorych na astmę atopową, potwierdzoną wynikami punktowych testów skórnych, zakwalifikowanych do immunoterapii swoistej, oraz 9 osób zdrowych, z ujemnymi wynikami testów skórnych. Ekspresję antygeny CD203c oceniano z wykorzystaniem cytometru przepływowego Cytomics FC500 (Beckman Coulter) za pomocą testu *Allergenicity Kit* (Beckman Coulter).

Wyniki: Za wynik dodatni uznano aktywację bazofilów na poziomie $> 15\%$ w stosunku do kontroli negatywnej. U wszystkich chorych na astmę atopową wykazano podwyższony poziom aktywacji bazofilów powyżej poziomu odcięcia. Średni poziom aktywacji bazofilów pod wpływem antygenów pyłków traw dla osób uczulonych wyniósł $50,95 \pm 15,7\%$ (mediana 49,7%, zakres 1,91–72,42%) w stosunku do 1,91% (0,00–7,96%) dla osób zdrowych ($p = 0,002$). Z kolei poziom aktywacji bazofilów pod wpływem antygenów *D. pteronyssinus* wyniósł $40,6 \pm 25,2\%$ u osób uczulonych, zaś u osób nieuczulonych — $2,51 \pm 1,96\%$ ($p = 0,0003$). Bazofile 21 badanych osób odpowiadały na stymulator kontrolny (anty-IgE) ($44,1 \pm 18,9\%$). W żadnej z badanych próbek nie uzyskano pobudzenia pod wpływem kontroli negatywnej ($2,03 \pm 1,19\%$, $p < 0,0001$). Czulość i swoistość zastosowanego testu wyniosły odpowiednio 92,3 i 100%.

Wnioski: Test z wykorzystaniem detekcji antygeny CD203c może być bardzo użyteczny w diagnostyce alergii i — być może — w monitorowaniu immunoterapii swoistej.

Słowa kluczowe: CD203c, bazofile, choroby atopowe, pyłki traw, roztocza kurzu domowego

Pneumonol. Alergol. Pol. 2009; 77: 138–144

Wstęp

Według najnowszych danych na alergiczny nieżyt nosa cierpi 25% populacji polskiej [1]. Od lat siedemdziesiątych minionego wieku wciąż wzrasta częstość występowania chorób atopowych we współczesnych społeczeństwach [2–4]. „Złotym standardem” w diagnostyce schorzeń o podłożu atopowym są punktowe testy skórne i ocena ilościowa swoistego IgE w surowicy [5]. Do najczęściej uczulających alergenów należą pyłki traw, roztocza kurzu domowego, orzechy, leki i jad owadów błonkoskrzydłych. W niektórych przypadkach odpowiedź organizmu na obce białka jest tak silna, że dochodzi do rozwoju ciężkiej reakcji anafilaktycznej [6, 7]. U tych chorych wykonanie testów *in vivo* (skórnych i prowokacyjnych) może być bardzo niebezpieczne, dlatego w tych przypadkach rekomendowane jest wykonanie diagnostyki *in vitro*.

Głównymi komórkami efektorowymi odpowiedzialnymi za rozwój ostrej reakcji IgE-zależnej są bazofile i komórki tuczne. Na powierzchni błony komórkowej tych komórek znajdują się receptory o wysokim powinowactwie dla immunoglobuliny E (FcεRI). Po związaniu receptora z IgE u osób uczulonych dochodzi do „mostkowania” receptorów za pomocą cząsteczki alergenu, co prowadzi do degranulacji komórek. Skutkiem tej reakcji jest uwolnienie do przestrzeni pozakomórkowej mediatorów reakcji alergicznej, takich jak histamina i liczne cytokiny. Zjawisku temu towarzyszą zmiany na powierzchni błony komórkowej, polegające między innymi na zwiększeniu ekspresji antygenów charakterystycznych dla stanu aktywacji (CD13, CD63, CD107a, CD164, CD203c) [6]. Metodami *in vitro* można oceniać między innymi stężenie mediatorów reakcji alergicznych, takich jak histamina i liczne

cytokiny, uwalnianych z ziarnistości bazofilów podczas degranulacji. Badania te są jednak bardzo czasochłonne, a ich wyniki nie zawsze korelują ze stanem klinicznym. Alternatywę stanowią badania metodą cytometrii przepływowej, dzięki którym wykrywa się charakterystyczne antygeny na powierzchni komórek, stosując do tego przeciwciała monoklonalne wyznakowane fluorochromem [6, 7].

Jednym z ważniejszych markerów aktywacji bazofilów jest antygen CD203c. To białko (neuralny powierzchniowy antygen różnicowania neuronów, E-NPP3, PD-Iβ, B10, gp130^{RB13-6}) należy do wielogenowej rodziny pirofosfataz/fosfodiesteraz [7]. Jego potencjalna funkcja w odniesieniu do fizjologii bazofila pozostaje nieznana. Do dnia dzisiejszego nie wykazano ekspresji tego antygeny na żadnych innych komórkach poza bazofilami i mastocytami. Jego ekspresja wzrasta natychmiast po stymulacji alergenem powodującym degranulację lub po aktywacji przeciwciałami anty-IgE. Sugeruje to, że aktywacja CD203c ujawnia się po aktywacji receptorów FcεRI. W formie spoczynkowej bazofile wykazują bardzo słabą ekspresję cząsteczki CD203c, a nagły wzrost ekspresji CD203c na powierzchni błony w kilka minut po aktywacji wskazuje na fakt, że w cytoplazmie komórki muszą się znajdować rezerwy tego białka [8, 9].

Celem pracy była ocena przydatności oznaczania ekspresji antygeny CD203c w potwierdzaniu i/lub wykluczaniu alergii na pyłki traw i roztocza kurzu domowego.

Materiał i metody

Pacjenci

Przebadano 22 osoby, w tym 13 chorych na astmę atopową (6–16 lat), potwierdzoną wynikami punktowych testów skórnych, zakwalifikowa-

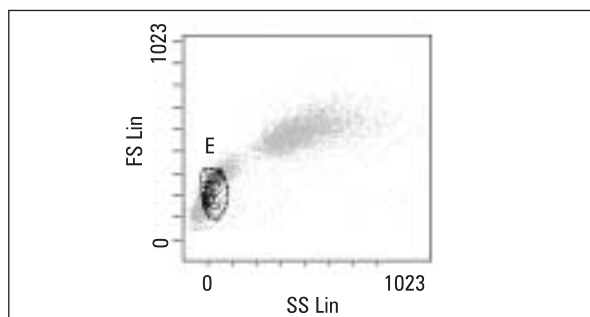
nych do immunoterapii swoistej, oraz 9 osób zdrowych (wiek odpowiadający grupie badanej), z ujemnymi wynikami testów skórnych i/lub ujemnymi wynikami testów *in vitro* wykrywającymi swoiste IgE w surowicy. Chorzy byli leczeni w Poradni Przyklinicznej Kliniki Pneumonologii i Alergologii Dziecięcej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Żaden z badanych nie otrzymywał leków antyhistaminowych ani kortykosteroidów doustnych. Badanie przeprowadzono przed rozpoczęciem immunoterapii doustnej. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Akademii Medycznej w Warszawie (obecnie Warszawski Uniwersytet Medyczny). Krew pobrano po uzyskaniu świadomej zgody chorego (lub jego rodziców) na udział w badaniu.

Test aktywacji bazofilów

Wszystkie badania zostały przeprowadzone w ciągu godziny od pozyskania materiału. Krew obwodową pobrano do probówek zawierających wersenian sodu (EDTA) w celu wykonania badania morfologii krwi. Do testu aktywacji bazofilów użyto 400 μ l krwi resztkowej.

Zasada testu aktywacji bazofilów opartego na ocenie ekspresji CD203c polega na cytometrycznym pomiarze poziomu ekspresji antygenu przed stymulacją roztworem alergenu i po niej. Komórki pobudzano roztworami alergenów do testów skórnych (Stallergens, France). Używano ich w rozcieńczeniu 1:500. Zawiesinę alergenów w glicerolu rozcieńczano w soli fizjologicznej buforowanej fosforanem (PBS, *phosphate-buffered saline*).

Ocenę aktywacji bazofilów przez pomiar ekspresji antygenu CD203c przeprowadzono testem *Allergenicity Kit*, zgodnie z instrukcją producenta (Beckmann Coulter). Jednocześnie wykonywano kontrolę pozytywną (wywołanie degranulacji za pomocą przeciwciał monoklonalnych anti-IgE), kontrolę negatywną (inkubacja z PBS) i dwie próby badane (roztwór antygenów pyłków traw i roztwór antygenów *D. pteronyssinus*). Roztwór ten dodawano do mieszaniny przeciwciał monoklonalnych anti-CD203c, anti-CRTH2 i anti-CD3 sprzężonych z fluorochromami, odpowiednio PE, FITC i PC5. Następnie do próbki dodawano 100 μ l roztworu aktywującego (*activation solution*) i 100 μ l pełnej krwi obwodowej. Mieszaninę po krótkim wytrząsaniu inkubowano 15 minut w temperaturze 37°C i wilgotności > 95%. Następnie zatrzymywano reakcję przez dodanie roztworu hamującego (*stop solution*), lizowano erytrocyty 2 ml roztworu lizującego, przepłukiwano dwukrotnie w 5 ml PBS i zawieszano w 0,5 ml roztworu utrwalającego. Próbkę odczytywano na cytometrze przepływowym



Rycina 1. Umieszczenie populacji granulocytów zasadochłonnych w rozkładzie FS/SS krwi obwodowej. Komórki te znajdują się w regionie „E”, między populacjami limfocytów i monocytów

Figure 1. Location of the basophil's population at FS/SS cytogram of peripheral blood. Cells are placed in "E" region between lymphocytes and monocytes populations

Cytomics FC500 (Beckmann Coulter) w ciągu pół godziny od zakończenia procedury przygotowawczej.

Analizowana populacja komórek w rozkładzie FS/SS (wielkość/ziarnistość komórek) znajdowała się między populacjami limfocytów i monocytów (ryc. 1).

Na podstawie oceny ekspresji antygenu CD3 z dalszej analizy wykluczano limfocyty Th2, również wykazujące ekspresję antygenu CRTH2. Wyodrębnione bazofile charakteryzowały się niewielką ekspresją antygenu CD203c, znacznym poziomem ekspresji antygenu CRTH2 i brakiem ekspresji CD3. W kontroli negatywnej (inkubacja z PBS) ustalano próg odcięcia aktywacji – poziom ekspresji CD203c w tej próbie ustawiano na poziomie < 5%. Taki poziom samoistnej aktywacji przyjęto za dopuszczalny, opierając się na danych z literatury [3, 7]. W kontroli pozytywnej oceniano zdolność bazofilów do aktywacji na drodze IgE-zależnej (stymulacja przeciwciałami anti-IgE). W badanych próbach oceniano wzrost ekspresji CD203c pod wpływem alergenów poddanych badaniu. Za wynik dodatni uznano aktywację ponad 15% bazofilów. Wartość tę przyjęto na podstawie doniesień innych autorów [7, 10] oraz doświadczeń własnych (ryc. 2).

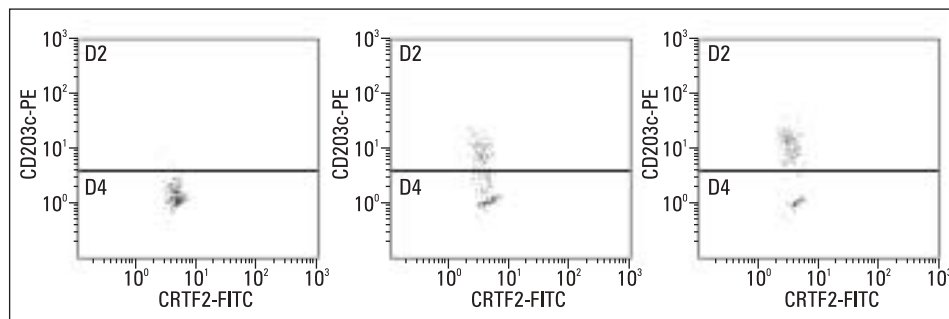
Analiza statystyczna

Istotności statystyczne oszacowano nieparametrycznym testem Mann-Whitneya. Poziom istotności ustalono dla wartości $p < 0,05$. Czułość i swoistość metody obliczono według wzorów:

$$\text{Czułość} = \text{PD} / (\text{PD} + \text{FU}) \times 100\%$$

$$\text{Swoistość} = \text{PU} / (\text{PU} + \text{FD}) \times 100\%$$

gdzie: PD — wyniki prawdziwie dodatnie, FU — wyniki fałszywie ujemne, PU — wyniki prawdziwie ujemne, FD — wyniki fałszywie dodatnie.



Rycina 2. Aktywacja bazofilów pod wpływem antygenów pyłków traw u osoby uczulonej. Bramkowanie wykonano, stosując protokół CD3/CRTF2/CD203c. Pierwszy cytogram przedstawia bazofile spoczynkowe, drugi — bazofile aktywowane przeciwciałami anti-IgE, trzeci zaś — aktywację bazofilów po inkubacji z pyłkami traw

Figure 2. Basophil's activation after grass pollen antigens stimulation in atopic patient. Gating was set with CD3/CRTF2/CD203c protocol. Resting basophil are presented at the first cytogram, AntiIgE stimulated at the second and grass pollen antigens activated at the third

Wyniki

W celu wykluczenia aktywacji pod wpływem glicerolu (rozpuszczalnika dla alergenów), oznaczono poziom aktywacji bazofilów, używając go jako stymulatora. Poziom aktywacji wyniósł 4,8% w stosunku do 3,85% w kontroli negatywnej, tak więc stwierdzono, że glicerol nie pobudza granulocytów zasadochłonnych na drodze IgE-zależnej. Zastosowane do badań alergeny rozcieńczono PBS 1:500, po wcześniejszej ocenie aktywacji przy rozcieńczeniach 1:10, 1:50, 1:100, 1:200, 1:500 i 1:1000. Te przedwstępne badania przeprowadzono w grupie 6 dorosłych ochotników, spośród których 3 miało zdiagnozowaną alergię na kurz i trawy, zaś 3 było całkowicie zdrowych. Żaden z powyższych roztworów nie powodował nieswoistej aktywacji bazofilów u osób zdrowych, natomiast wszystkie wywoływały aktywację bazofilów osób uczulonych (ryc. 3).

Przebadano ogółem 22 osoby, z których 6 (27%) było uczulonych tylko na pyłki traw, 2 (9%) — tylko na antygeny *D. pteronyssinus*, 5 (23%) było uczulonych na obydwa alergeny, a 9 (41%) nie było uczulonych na żaden z badanych alergenów. Wyniki podano w tabeli 1.

U jednego chorego test aktywacji bazofilów był ujemny, u pozostałych atopików uzyskano rezultat pozytywny. Nie odnotowano żadnego wyniku fałszywie dodatniego w grupie kontrolnej. Na tej podstawie oceniono czułość testu w odniesieniu do obydwu alergenów na 92,3%, a jego swoistość na 100%. Jednocześnie wyznaczono czułości osobno dla obu badanych czynników wywołujących degranulację bazofili. W przypadku antygenów pyłków traw wyniosła ona 100% (wszyscy badani pacjenci odpowiadali aktywacją granulocytów zasadochłonnych na stymulację), zaś w przypadku antygenów *D. pteronyssinus* czułość testu wyniosła 87,5% (je-

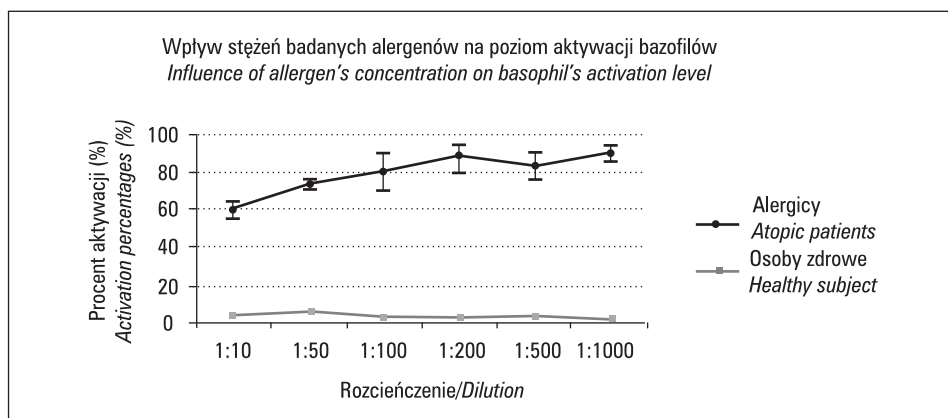
den pacjent z chorobą atopową nie odpowiedział degranulacją na stymulację swoistym antygenem).

Wyjściowa ekspresja antygeny CD203c (podstawowy poziom aktywacji) była różna u różnych chorych. W 12 przypadkach podstawowy poziom aktywacji był zbliżony (poziomy niskie w kontroli ujemnej, średnia fluorescencja $6,46 \pm 2,27$). Uwagę zwraca wysoki poziom samoistnej (spontanicznej) aktywacji bazofilów u jednego spośród 13 badanych chorych (nr 10), oceniany na podstawie średniej fluorescencji fluorochromu związanego z antygenem CD203c (średnia fluorescencja 19,3) (ryc. 4). Przyjęcie linii odcięcia na poziomie $< 5\%$ dla kontroli negatywnej u osoby nr 10 wiązało się ze stosunkowo niskim poziomem aktywacji w kontroli pozytywnej i w badanej próbie (odpowiednio 15,8 i 21%) (ryc. 5). Wyniki te znacznie odbiegają od uzyskanych średnich, odpowiednio $45,9 \pm 17,1\%$ dla kontroli pozytywnej i $50,9 \pm 20,7\%$ dla próby badanej.

Bazofile 21 z 22 badanych (9 zdrowych i 12 atopików) reagowały pobudzeniem na kontakt z anti-IgE ($44,1 \pm 18,9\%$). W żadnej z badanych próbek nie uzyskano pobudzenia w próbkach kontroli negatywnej ($2,03 \pm 1,19\%$), $p < 0,0001$.

W przypadku jednego chorego (nr 13) odnotowano brak odpowiedzi komórek efektorowych na stymulację zarówno przeciwciałami anti-IgE, jak i swoistymi alergenami (*D. pteronyssinus*), mimo dodatniego wyniku badania całkowitego i swoistego IgE.

Zaobserwowano istotną statystycznie ($p = 0,0008$) różnicę wyniku testu aktywacji bazofilów pod wpływem pyłków traw dla pacjentów uczulonych na ten alergen w stosunku do grupy kontrolnej. Analizowano łącznie 114–880 komórek (mediana 247 komórek). Średni odsetek aktywowanych bazofilów u osób uczulonych wyniósł $46,86 \pm 20,9\%$ (mediana 49,7%, zakres 1,91–72,42%), zaś u osób zdrowych mediana aktywacji wyniosła 1,91% (0,00–7,96%) (ryc. 6).



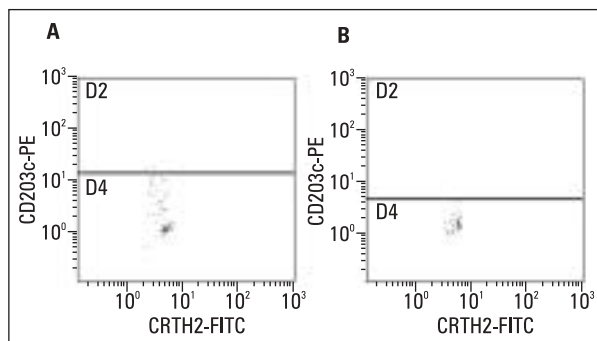
Rycina 3. Wpływ różnych stężeń badanych alergenów (rozcieńczenia od 1:10 do 1:1000) na poziom aktywacji bazofilów u osób uczulonych i w grupie kontrolnej. Grupę badaną stanowiło 6 dorosłych ochotników

Figure 3. Influence of analyzed allergens concentration (1:10 – 1:1000) on basophil activation level in atopic and nonatopic subjects

Tabela 1. Odsetek aktywowanych bazofilów pod wpływem PBS, anti-IgE, pyłków traw i roztoczy kurzu domowego. Pacjenci 1–13 to osoby z atopią, pacjenci 14–22 stanowią grupę kontrolną

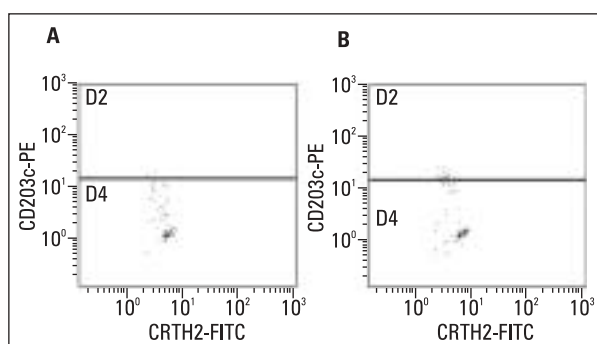
Table 1. Percentages of activated basophils after PBS, anti-IgE, grass pollen antigens and *D. pteronyssinus* antigens stimulation. Patients 1–13 are atopic, patients 14–22 — healthy subjects

Pacjent <i>Patient</i>	Proc. aktywacji w kontroli negatywnej <i>% of activated cells in negative control</i>	Proc. aktywacji w kontroli pozytywnej <i>% of activated cells in positive control</i>	Proc. aktywacji pod wpływem pyłków traw <i>% of activated cells after grass pollen antigens stimulation</i>	Proc. aktywacji pod wpływem <i>D. pteronyssinus</i> <i>% of activated cells after <i>D. pteronyssinus</i> stimulation</i>
1	2,67	46,79	63,87	62,72
2	2,7	43,67	43,49	39,74
3	0,99	48,31	46,49	2,36
4	3,71	56,12	57,4	20,07
5	1	22,73	52,91	3,67
6	1,28	22,53	39,68	50,63
7	2,45	37,96	56,02	24,88
8	2,34	50,71	72,42	1,75
9	1,46	42,31	35,75	–
10	1,69	15,8	20,99	1,32
11	5,04	46,82	71,48	4,57
12	0,87	57,89	–	78,71
13	1,42	4,47	1,91	7,63
14	3,85	89,02	–	4,38
15	2,49	20,83	0,97	0,96
16	3,23	50,23	3,36	1,89
17	0,44	43,17	0,48	1,9
18	1,87	49,77	0,89	0
19	2,22	75,93	2,24	3,56
20	1,38	42,8	0	0,47
21	0,01	53,05	7,96	1,12
22	1,56	48,32	6,49	7,23



Rycina 4. Poziom aktywacji spontanicznej u chorego z wysokim poziomem ekspresji antygenu CD203c przed stymulacją alergenem (A) i u chorego o niskim poziomie aktywacji spontanicznej (B)

Figure 4. The spontaneous basophil's activation level from atopic patient with high CD203c expression before allergen stimulation (A) and from atopic patient with low CD203c expression (B)



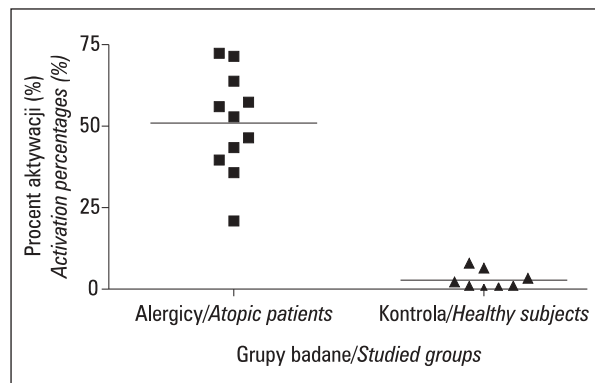
Rycina 5. Wysoki poziom aktywacji spontanicznej (A) skutkuje stosunkowo niskim odsetkiem komórek pobudzonych po aktywacji (15,8%) (B)

Figure 5. High level of spontaneous basophil activation (A) causes low percentage of activated cells after IgE stimulation (B)

Do analizy aktywacji bazofilów pod wpływem antygenów *D. pteronyssinus* włączono 79–1145 komórek (mediana 256 komórek). Średni odsetek pobudzonych bazofilów u osób uczulonych wyniósł $40,6 \pm 25,2\%$, a u osób zdrowych $2,39 \pm 2,29\%$, $p = 0,0002$ (ryc. 7).

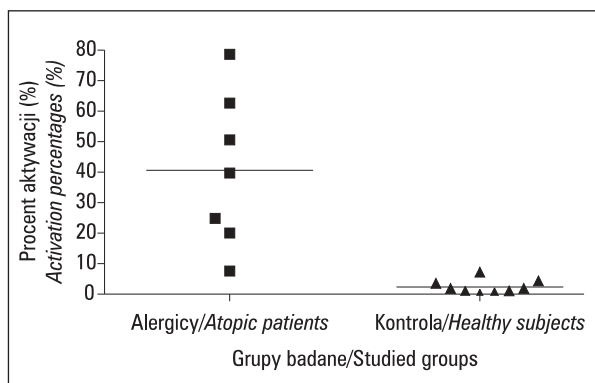
Omówienie

Celem pracy była próba oceny ekspresji antygenu CD203c na bazofilach atopików w porównaniu z osobami zdrowymi, bez cech atopii, przed aktywacją swoistymi alergenami i po niej. Antygen CD203c jest swoistym markerem komórek z linii granulocytów zasadochłonnych. Wykazano, że jego powierzchniowa ekspresja wzrasta nagle po „mostkowaniu” receptorów FcεRI, stąd postuluje się, że jest on bardzo dobrym markerem reakcji IgE-zależnych [6]. Wielu autorów porównywało przydatność oznaczania tego antygenu i markera CD63



Rycina 6. Porównanie odsetka bazofilów aktywowanych antygenami pyłków traw u atopików i w grupie kontrolnej, $p = 0,0008$

Figure 6. Comparison of percentages of basophils activated with grass pollen antigens in atopic and healthy subject, $p = 0.0003$



Rycina 7. Porównanie odsetka bazofilów aktywowanych antygenami *D. pteronyssinus* w grupie atopików i w grupie kontrolnej, $p = 0,0002$

Figure 7. Comparison of percentages of basophils activated with *D. pteronyssinus* antigens in atopic and healthy subject, $p = 0.0002$

do oceny aktywacji bazofilów [3, 7, 10, 11]. Wykazano, że test oparty na ocenie ekspresji CD203c charakteryzuje się większą czułością i swoistością w odniesieniu do większości badanych alergenów, w tym pyłków traw i antygenów rozroczu kurzu domowego. Dowiedziano, że czułość i swoistość cytometrycznych testów aktywacji bazofilów dla alergenów inhalacyjnych wynosiła około 90%, a współczynnik korelacji między testami z zastosowaniem oceny ekspresji CD203c i CD63 był na poziomie 0,76 [8]. Czułość testu badającego ekspresję antygenu CD203c przy wykrywaniu alergii na lateks wynosiła 75% w porównaniu z 50-procentową czułością testu opartego na wykrywaniu antygenu CD63 [7]. W badaniach nad aktywacją bazofilów pod wpływem jadów owadów błonkoskrzydłych wykazano wyższą czułość testu wykrywającego ekspresję antygenu CD203c niż testu wykrywającego ekspresję antygenu CD63 (97 vs. 89%) [10]. Z kolei przy ocenie nadwrażliwości na

leki (głównie nasenne i znieczulające) czułość testu wykrywającego CD203c wyniosła 36%, a testu oceniającego ekspresję CD63 — 79% [2]. W niniejszej pracy oceniano odpowiedź na pyłki traw i alergen *D. pteronyssinus*, ze względu na ich powszechność i częstość wywoływania reakcji atopowych. Zastosowany w tym celu test wykazał 100% czułości i swoistości dla aktywacji pod wpływem pyłków traw i 87,5% czułości oraz 100% swoistości dla aktywacji pod wpływem antygenów *D. pteronyssinus*. Tak wysoka swoistość jest potwierdzona przez innych autorów [3], jednak uzyskana czułość testu nieco odbiega od wyników uzyskanych przez innych badaczy [7, 10–12]. W innych badaniach czułość testu waha się w granicach od 75% dla alergii na lateks [7] do 98% w przypadku alergii na jad pszczoł [10]. Różnice mogą być spowodowane niewielką liczebnością badanej grupy i odmiennym doбором alergenów. Podobnie jak w badaniach innych autorów, obejmujących większą liczbę chorych, odnotowano przypadek chorego nieodpowiadającego na alergen mimo obecności w surowicy swoistych IgE (tzw. *non-responder*). Chorzy tacy stanowią około 5% populacji [13]. Brak odpowiedzi granulocytów zasadochłonnych na stymulację IgE-zależną tłumaczy się zaburzeniem szlaku przekazywania sygnałów wewnątrzkomórkowych [14]. Niewrażliwość bazofilów na stymulację receptora dla IgE może być skutkiem zmniejszonej ekspresji kinaz tyrozynowych Syk. Postuluje się również, że wpływ na taki stan mogą mieć zaburzenia ekspresji kinaz Fyn i Lyn. Dowiedziono też, że budowa łańcucha receptora o wysokim powinowactwie dla IgE (FcεRI) nie ma wpływu na możliwość odpowiedzi na IgE-zależne bodźce [14].

Na uwagę zasługują wysokie poziomy spontanicznej aktywacji bazofilów i związane z tym niskie poziomy aktywacji w kontroli pozytywnej u jednego z badanych chorych. Bazofile, na powierzchni których wykrywa się wysoką ekspresję markerów aktywacji bez wcześniejszej stymulacji alergenem, są odpowiedzialne za stale obecne objawy choroby atopowej. Taka sytuacja może sugerować przetrwałą aktywację bazofilów i ostrą chorobę atopową lub może być początkową reakcją na odczulanie [15]. Zwiększony poziom ekspresji CD203c na spoczynkowych granulocytach zasadochłonnych może być wynikiem reakcji na prowadzoną terapię kortykosteroidami i lekami przeciwhistaminowymi [10]. Wysoka wyjściowa ekspresja CD203c może być również wynikiem trwającego procesu zapalnego, ponieważ wykazano, że jedna z cytokin zapalnych (IL-3) może pobudzać ekspresję tego antygeny na powierzchni granulocytów zasadochłonnych [13]. Pacjent, u którego odnotowano wysoką spontaniczną ekspresję CD203c,

nie był poddawany wcześniejszej immunoterapii, nie stosował żadnych leków mogących zaktywować badane komórki, nie był również uczulony na inny alergen i nie przechodził stanu zapalnego w ciągu ostatnich tygodni przed badaniem. Wy tłumaczeniem zaobserwowanego zjawiska może być fakt, że badanie przeprowadzono na początku kwietnia, kiedy część traw rozpoczyna pylenie. Istnieje więc prawdopodobieństwo, że badane komórki mogły być już wcześniej pobudzone przez znajdujące się w powietrzu alergeny wziewne, jednak pacjent nie miał jeszcze objawów nasilonej degranulacji bazofilów.

Podsumowując, uzyskane wyniki wskazują na dużą przydatność oceny ekspresji antygeny CD203c jako markera aktywacji bazofilów pod wpływem antygenów pyłków traw i *D. pteronyssinus*. Test ten można stosować jako badanie dodatkowe przy potwierdzaniu nadwrażliwości o podłożu atopowym oraz przy przeciwwskazaniach do wykonania testów skórnych.

Piśmiennictwo

1. Samoliński B., Hałat Z., Samolińska-Zawisza U. i wsp. Epidemiologia nieżytów nosa, astmy i AZS na podstawie badań ECRHS i ISAAC w Polsce. *Alergia* 2007; 3: 10–12.
2. Saporta M., Kamei S., Persi L., Bousquet J., Arnoux B. Basophil activation during pollen season in patients monosensitized to grass pollen. *Allergy* 2001; 56: 442–444.
3. Sudheer P.S., Hall J.E., Read G.F., Rowbottom A.W., Williams P.E. Flow cytometric investigation of per-anaesthetic anaphylaxis using CD63 and CD203c. *Anaesthesia* 2005; 60: 251–256.
4. Stelmach W., Bobrowska M., Stelmach I. Czynniki ryzyka astmy oskrzelowej u dzieci w regionie łódzkim. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2004; 72: 170–176.
5. Crockard A.D., Ennis M. Laboratory-based allergy diagnosis: should we go with the flow? *Clin. Exp. Allergy* 2001; 31: 975–977.
6. 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; 3–9.
7. Boumiza R., Monneret G., Forissier M.F., Gutowski M.C., Powell W.S., Bienvenu J. Marked improvement of the basophil activation test by detecting CD203c instead of CD63. *Clin. Exp. Allergy* 2003; 33: 259–265.
8. Ebo D.G., Sainte-Laudy J., Bridts C.H. i wsp. Flow-assisted allergy diagnosis: current applications and future perspectives. *Allergy* 2006; 61: 1028–1039.
9. Triggiani M., Marone G. Basophil's secrets revealed by flow cytometry. *Allergy* 2006; 61: 1025–1027.
10. Eberlein-Konig B., Varga R., Mempel M., Darsow U., Behrendt H., Ring J. Comparison of basophil activation tests using CD63 or CD203c expression in patients with insect venom allergy. *Allergy* 2006; 61: 1084–1085.
11. Ocmant A., Peignois Y., Mulier S., Hanssens L., Michils A., Schandene L. Flow cytometry for basophil activation markers: The measurement of CD203c up-regulation is as reliable as CD63 expression in the diagnosis of cat allergy. *J. Immunol. Methods* 2007; 320: 40–48.
12. Dubois A.E.J., van der Hiede S. Basophil-activation tests in hymenoptera allergy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2007; 7: 346–349.
13. Valent P., Hauswirth A.W., Natter S., Sperr W.R., Buhning H.J., Valenta R. Assay for measuring in vitro basophil activation induced by recombinant allergens. *Methods* 2004; 32: 265–270.
14. Jensen B.M., Assing K., Hummelshoj L., Glue C., Skov P.S., Poulsen L.K. Are basophile histamine release and high affinity IgE receptor expression involved in asymptomatic skin sensitization? *Allergy* 2006; 61: 303–310.
15. Hauswirth A.W., Natter S., Ghannadan M., Majlesi Y., Scherthaner G.-H., Sperr W.R. i wsp. Recombinant allergens promote expression of CD203c on basophil in sensitized individuals. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2002; 110: 102–109.