ISSN 1814-6023 (print)
УДК 612.112.93:571.27

Поступила в редакцию 09.08.2017
Received 09.08.2017

И. В. Романова[1], А. Е. Гончаров[1], Н. И. Дударева[2]

[1]Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, Минск, Республика Беларусь
[2]10-я городская клиническая больница, Минск, Республика Беларусь

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ПРОВЕДЕНИЯ ТЕСТА АКТИВАЦИИ БАЗОФИЛОВ

Аннотация. Оптимизированы условия постановки и учета теста активации базофилов (ТАБ) для лабораторной диагностики IgE-опосредованной аллергии. Установлены оптимальные условия хранения венозной крови для проведения ТАБ: не более 4 ч при температуре 18–25 °С. Адаптировано и обосновано преимущество применения форбол-12-миристат-13-ацетата в качестве неспецифического положительного контроля. Исследована экспрессия молекул, относящихся к разным функциональным классам, на неактивированных и активированных базофилах. Показано, что молекулы CD11b, CD13, CD69, CD107a, CD164 и CD300a усиливают экспрессию на базофилах под влиянием антитела к IgE и могут быть использованы в качестве дополнительных маркеров при постановке ТАБ.

Ключевые слова: аллергия, базофилы, маркеры дегрануляции, проточная цитометрия

Для цитирования: Романова, И. В. Оптимизация условий проведения теста активации базофилов / И. В. Романова, А. Е. Гончаров, Н. И. Дударева // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2017. – №4. – С. 48–59.

I. U. Ramanava[1], A. Y. Hancharou[1], N. I. Dudarava[2]

[1]The Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Republic of Belarus
[2]10th City Clinical Hospital, Minsk, Republic of Belarus

OPTIMIZATION OF BASOPHIL ACTIVATION TEST CONDITIONS

Abstract. The basophil activation test (BAT) is a perspective method for allergy diagnosis. However, the optimization and standardization of the method are required. The optimal conditions for the peripheral blood storage for BAT were established: the blood should be stored at room temperature (18–25 °C), and a test should be performed within 4 h after blood collection. The optimal positive control – phorbol 12-myristate 13-acetate was chosen due to effective basophil activation and low cost. The expression of molecules on both unstimulated and activated basophils was studied. It was shown that CD11b, CD13, CD69, CD107a, CD164 and CD300a molecules may be used to improve the BAT efficiency.

Keywords: allergy, basophils, degranulation markers, basophil activation test, flow cytometry

For citation: Ramanava I. U., Hancharou A. Y., Dudarava N. I. Optimization of basophil activation test conditions. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series,* 2017, no. 4, pp. 48–59 (in Russian).

Введение. Тест активации базофилов (ТАБ) в качестве метода диагностики гиперчувствительности немедленного типа впервые был предложен в 1994 г. Saint-Laudy [1]. В основу метода легли работы E. Knol [2], в которых было показано, что базофилы под влиянием IgE-опосредованной активации экспрессируют молекулу CD63. В процессе дегрануляции базофилов происходит интеграция мембраны гистаминсодержащих гранул с поверхностной мембраной, что приводит к высвобождению медиаторов, а также к появлению на поверхности клеток LAMP-молекулы CD63, которая практически не регистрируется на покоящихся базофилах [3]. Маркер дегрануляции базофилов – CD63, будучи исторически первым, наиболее часто применяется в диагностике IgE-опосредованной аллергии к различным аллергенам [4]. Хорошо изученным маркером, усиливающим экспрессию при активации базофилов, является также высокоспецифичная для базофилов молекула – CD203c [5]. Недостатком применения данной молекулы в качестве маркера активации является ее конститутивная экспрессия на базофилах, поэтому для диагностики используется такой довольно сложный для учета показатель, как интенсивность экспрессии. В последующие годы рядом авторов были предложены и другие молекулы для проведения ТАБ: CD13, CD107a, CD164, однако данные о степени изменения экспрессии выше-

© Романова И. В., Гончаров А. Е., Дударева Н. И., 2017

указанных молекул на базофилах при их активации отсутствуют, что затрудняет их использование с целью диагностики аллергии [6].

Таким образом, в настоящее время для постановки ТАБ в арсенале специалистов фактически имеются всего два маркера активации базофилов: CD63 и CD203c. При этом CD203c является сложным для учета, что, соответственно, затрудняет его применение в клинической диагностике. Индивидуальные различия пациентов с IgE-опосредованной гиперчувствительностью в активации базофилов в ответ на внешние стимулы, а следовательно, и на степень изменения экспрессии CD63 служат основанием для поиска новых высокочувствительных и универсальных маркеров активации базофилов.

Другой нерешенной проблемой является отсутствие стандартизации при постановке ТАБ: имеющиеся протоколы (равно как и инструкции по применению к коммерческим тест-системам) рекомендуют зачастую совершенно разные условия хранения периферической крови, постановки реакции при использовании положительных контролей, преинкубации с интерлейкином-3 (ИЛ-3), выборе молекул-маркеров активации. Разные подходы к гейтированию базофилов, которые могут вносить существенный вклад в порой невысокую воспроизводимость ТАБ, исследованы нами ранее [7]. Таким образом, необходимость стандартизации метода, в частности выбор маркеров активации базофилов, сохраняет свою актуальность, что нашло отражение в позиционном документе Европейской академии аллергологии и клинической иммунологии (EAACI), датированном 2017 г. [8].

Цель исследования – оптимизация условий постановки теста активации базофилов: определение оптимального времени и температуры хранения образца периферической крови, выбор положительного контроля реакции, скрининг молекул, экспрессируемых базофилами, для оценки потенциала их использования в диагностике гиперчувствительности немедленного типа.

Объекты и методы исследований. Объектами для *in vitro* исследований служили 20 образцов периферической крови здоровых добровольцев, в анамнезе которых не отмечались аллергические реакции (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии). Забор крови производили из кубитальной вены в пробирку с гепарином в качестве антикоагулянта.

Определение оптимальных условий хранения крови для проведения ТАБ. Исследование активации базофилов под действием положительного контроля (моноклональное антитело anti-IgE (клон 4H10 (ExBio, Чехия)) проводили через 1, 4 и 24 ч после забора крови. Пробы периферической крови хранили при комнатной температуре (20 °С), в холодильнике при 4 °С и в термостате при 30 °С. Пробоподготовка заключалась в инкубации 100 мкл крови с антителом к IgE в течение 30 мин при 37 °С. После этого добавляли моноклональные антитела CD63 – FITC, клон CLBGran/12 (Beckman Coulter, США), CD123 – PE, клон SSDCLY107D2 (Beckman Coulter, США), HLA-DR – PE-Cy 7, клон Immu-357 (Beckman Coulter, США), CD203c – APC, клон NP4D6 (ExBio, Чехия), и оставляли пробы на 15 мин при 4 °С. Эритроциты лизировали раствором хлорида аммония (3 мл) на протяжении 10–15 мин при температуре 18–25 °С, а затем осаждали клетки путем центрифугирования при 250 g в течение 5 мин и производили их учет на проточном цитометре BD FACSCalibur.

Выбор положительного контроля. В качестве стимуляторов активации и дегрануляции базофилов использовали ряд веществ: человеческий рекомбинантный ИЛ-3 – 1 нг/мкл (Miltenyi Biotech, Германия), форбол-12-миристат-13-ацетат (ФМА) – 2 нг/мл, дибутирил-цАМФ (дб-цАМФ) – 1 мкг/мл, анти-fMLPR – 1 мкл/мл, липополисахарид (ЛПС) *E. coli* – 100 нг/мл (все реагенты производства Sigma-Aldrich, США), моноклональное антитело anti-IgE (клон 4H10 (ExBio, Чехия)) – 1 мкг/мл. Кровь инкубировали с вышеперечисленными веществами в течение 30 мин при 37 °С. Для завершения активации базофилов пробы помещали в морозильную камеру (–20 °С) на 1 мин (стоп-реакция). Дальнейшую пробоподготовку проводили так же, как указано выше.

Скрининг маркеров активации базофилов. Для иммунофенотипирования базофилов инкубировали 100 мкл периферической крови со следующими моноклональными антителами производства Beckman Coulter, США: CD32 – PE (клон 2E1), CD40 – PE (клон MAB89), CD55 – PE (клон JS11KSC2.3), CD63 – FITC (клон CLBGran/12), CD95 – PE (клон 7C11), CD105 – PE (клон 1G2), CD161 – PE (клон 191B8); производства ExBio, Чехия: CD11b – APC (клон MEM-174), CD13 – PerCP-Cy5.5 (клон WM15), CD15 – PE (клон MEM-158), CD16 – PE (клон lnk16), CD62L – PE (клон

LT-TD180), CD69 – PE (клон FN50), CD73 – PE (клон AD2), CD106 – PE (клон STA), CD203c – APC (клон NP4D6), CD300a – PE (клон MEM-260); производства Miltenyi Biotec, Германия: CD33 – FITC (клон AC104.3E3), CD68 – FITC (клон Y1/82A), CD284 – APC (клон HTA125); производства Becton Dickinson, США: CD11c – PE-Cy7 (клон B-ly6), CD107a – PE-Cy 7 (клон H4A3), CD164 – PE (клон N6B6), CD195 – FITC (клон 2D7/CCR5), CD205 – PE (клон MG38); производства BioLegend, США: CD35 – PE (клон E11), CD197 – PE-Cy7 (клон G043H7), CD282 – PE (клон TL2.1); производства Thermo Fisher Scientific, США: CD43 – PE (клон DF-T1), CD54 – FITC (клон MEM-111) и производства Abcam, Великобритания: CD88 – PE (клон 20/70). Активацию базофилов проводили при 37 °C в течение 30 мин. После этого эритроциты лизировали 15 мин при комнатной температуре. С помощью центрифугирования клетки осаждали и производили их учет на проточном цитометре BD FACSCalibur. Данные анализировали при помощи программного обеспечения Weasel версии 3.0.2 [9].

Статистический анализ. Статистическую обработку полученных данных выполняли при помощи программ Statistica версии 12 (StatSoft, США), StatPlus версии 4.9 (AnalystSoft, Канада) [10, 11]. Значения показателей представлены в виде Me (25–75), где Me – медиана, а 25 и 75 – интерквартильный размах в виде 25-й и 75-й процентилей. Учитывая отсутствие в большинстве исследованных выборок нормального распределения, для сравнения групп данных и изучения корреляционных взаимосвязей использовали непараметрические методы. В качестве критерия достоверности различий показателей принимали уровень значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. ***Определение оптимального времени хранения образца периферической крови для проведения ТАБ.*** Базофилы как объект исследования *ex vivo* весьма нестабильны и склонны к активации под действием различных неспецифических факторов, таких как резкие перепады температуры, длительное хранение и грубые манипуляции с образцом периферической крови, выделение базофилов на градиенте плотности и др. Для получения клинически значимых результатов ТАБ крайне важно отсутствие в отрицательном контроле признаков активации и дегрануляции базофилов, а продолжительность хранения образца крови не должна оказывать на это влияние. Образцы периферической крови исследовали через 1, 4 и 24 ч после забора. Данные промежутки времени были выбраны исходя из предполагаемого места забора крови (организации здравоохранения) с последующей доставкой в лабораторию для исследования. В течение 1 ч кровь может быть исследована при условии выполнении забора в учреждении, где находится лаборатория. В течение 4 ч образцы крови могут быть доставлены из одного учреждения в другое в пределах города. При заборе крови в другом районе или области для исследования образца понадобится приблизительно 24 ч.

Установлено, что длительное хранение образца крови приводит к двукратному увеличению процентного содержания $CD63^+$ базофилов в отрицательном контроле, подвергшихся дегрануляции: 10,65 (9,11–13,69) % – через 24 ч после забора крови, 4,76 (1,64–5,87) % – через 1 ч после ее забора ($p < 0,001$). При этом интенсивность экспрессии CD203c достоверно не изменилась через 24 ч после забора крови (110,7 (90,5–164,1) усл. ед.) в сравнении со значением показателя через 1 ч после ее забора (141,0 (90,7–179,3) усл. ед.), хотя имелась тенденция к снижению интенсивности экспрессии. Данный факт может существенно повлиять на интерпретацию результатов ТАБ. Маркеры активации и дегрануляции базофилов при исследовании через 4 ч после забора крови достоверно не отличались от значений при исследовании через 1 ч ($p = 0,078$), но в то же время наблюдалась тенденция к усилению спонтанной дегрануляции, выявляемой по маркеру CD63. Следует отметить, что в исследовании Sturm с соавт. [12] также было показано, что экспрессия CD203c после 4 ч хранения начинает снижаться. Это подтверждается и полученными нами данными.

Таким образом, проведенные исследования показали, что время хранения образца крови не должно превышать 4 ч после забора крови. Более длительное хранение может привести к ложноотрицательным результатам ТАБ.

Определение оптимальных температурных условий при хранении образцов периферической крови для проведения ТАБ. Учитывая, что образцы периферической крови пациентов для диагностики будут доставляться из различных медицинских учреждений, необходимо определить условия транспортировки и хранения образцов. Как указано выше, базофилы крайне нестабильны при резких перепадах температуры. Было проведено исследование активации базофилов

при хранении образца периферической крови при комнатной температуре (20 °С), в холодильнике (4 °С) и при температуре 30 °С (имитация хранения в летний период). Показано, что низкая температура хранения образца периферической крови (4 °С) перед проведением ТАБ приводит к подавлению процесса активации и дегрануляции базофилов. Относительное количество активированных базофилов при температуре 4 °С было ниже, чем при хранении их при комнатной температуре (CD63 – 16,4 (13,4–18,6) и 22,75 (18,6–27,6) % соответственно, $p = 0{,}034$). В то же время высокая температура оказывала негативное влияние на стабильность базофилов, при этом выявлено высокое процентное содержание базофилов, подвергшихся спонтанной дегрануляции в отрицательном контроле, что, вероятно, может приводить к ошибкам при проведении ТАБ. Так, в отличие от проб, хранившихся при комнатной температуре, доля хранившихся при 30 °С базофилов со спонтанной дегрануляцией достоверно выше (CD63 – 4,35 (3,7–5,8) и 8,65 (7,3–11,6) % соответственно, $p = 0{,}001$).

Таким образом, для оптимальной оценки теста активации базофилов хранение и транспортировка образца периферической крови должны осуществляться в условиях комнатной температуры (18–25 ºС). В идеале постановка ТАБ должна выполняться непосредственно в том же учреждении, в котором осуществляется забор крови.

Выбор положительного контроля. Корректная интерпретация результатов теста активации базофилов требует наличия надежных отрицательного и положительного контролей. Отрицательный контроль необходим для оценки спонтанной активации базофилов и подразумевает инкубацию клеток в идентичных условиях, что и остальные пробы, но без использования активирующих факторов. С помощью положительного контроля оценивают способность базофилов дегранулировать в ответ на неспецифические стимулы, что позволяет исключить ложноотрицательные реакции.

В исследовании был задействован ряд иммуноактивных веществ, способных к неспецифической активации клеток иммунной системы. Показано, что ИЛ-3 незначительно усиливает интенсивность и процент экспрессии молекулы CD63 (4,0 (2,6–5,6) %) на базофилах в сравнении с контролем. Однако ИЛ-3 является, в целом, потенциальным праймирующим агентом для базофилов, который усиливает ответ базофилов на другие стимулы [13]. Таким образом, ИЛ-3 целесообразнее использовать в качестве предварительной стимуляции слабыми аллергенами, например лекарственным средствами.

Установлено, что дибутирил-цАМФ и ЛПС обладают слабыми стимулирующими свойствами в отношении базофилов. Отсутствие, а в случае с ЛПС даже некоторое снижение интенсивности экспрессии CD203c и CD63 говорит о неприемлемости их использования в качестве положительного контроля (рис. 1).

Хемотаксический пептид fMLP активирует базофилы по IgE-независимому пути, связываясь с рецептором FPR-1, который активирует MAPK-киназу и фосфолипазу С. Пептид fMLP связывается с двумя рецепторами, экспрессируемыми на базофилах: с рецептором к формил-пептиду (FPR) и с формил-пептид-подобным рецептором 1 (FPRL1). Данные рецепторы активируют внутриклеточные способы активации, такие как MEK–ERK путь, что приводит к хемотаксису и высвобождению медиаторов, включая лейкотриен С4 и гистамин [14]. Использованное нами моноклональное антитело к рецептору fMLP, имитирующего воздействие fMLP, показало, что данный положительный контроль приводит к недостаточной активации базофилов (CD63 – 7,4 (5,9–11,8) %).

Механизмом действия ФМА на клетки является активация протеинкиназы С, что делает ФМА фактически универсальным активатором. Исходя из предшествующих исследований других клеточных популяций, а также данных литературы [15, 16], первоначальная концентрация ФМА, которая была использована в экспериментах, составляла 20–25 нг/мл. Однако при этом наблюдалось чрезмерно большое количество клеток, подвергшихся апоптозу или некрозу, что существенно затрудняло выделение региона базофилов на цитограммах. После проведения серии экспериментов было установлено, что оптимальная концентрация ФМА составляет 2 нг/мл. Воздействие на базофилы ФМА приводит к значительной активации клеток с увеличением интенсивности экспрессии CD203c и значимой дегрануляцией базофилов, определяемой по маркеру CD63 (31,6 (25,9–33,8) %). При этом содержание мертвых клеток

не превышало 5 %. Таким образом, в результате исследований в качестве положительного контроля с целью неспецифической активации базофилов нами выбран ФМА в небольшой концентрации (2 нг/мл). Помимо достаточной активации базофилов выбор также обусловлен невысокой стоимостью реагента.

Наличие такого феномена, как «неотвечающие базофилы» [17], требует использования второго положительного контроля, который подтверждал бы активацию базофилов при взаимодействии с рецепторами к IgE. С целью оценки специфической активации базофилов использовали моноклональное антитело к IgE (клон 4H10) (рис. 1). Установлено, что содержание дегранулирующих базофилов с применением данного положительного контроля составляет 58,9 (48,1–73,2) % по маркеру CD63, что удовлетворяет требованиям, предъявляемым к положительному контролю реакции.

Оценка маркеров активации и дегрануляции базофилов. Базофилы принимают активное участие в различных воспалительных реакциях, секретируют большое количество ИЛ-4, способствуя тем самым развитию иммунного ответа по Th2 типу. Функциональная активность базофилов, способность к миграции, ответ на специфические и неспецифические

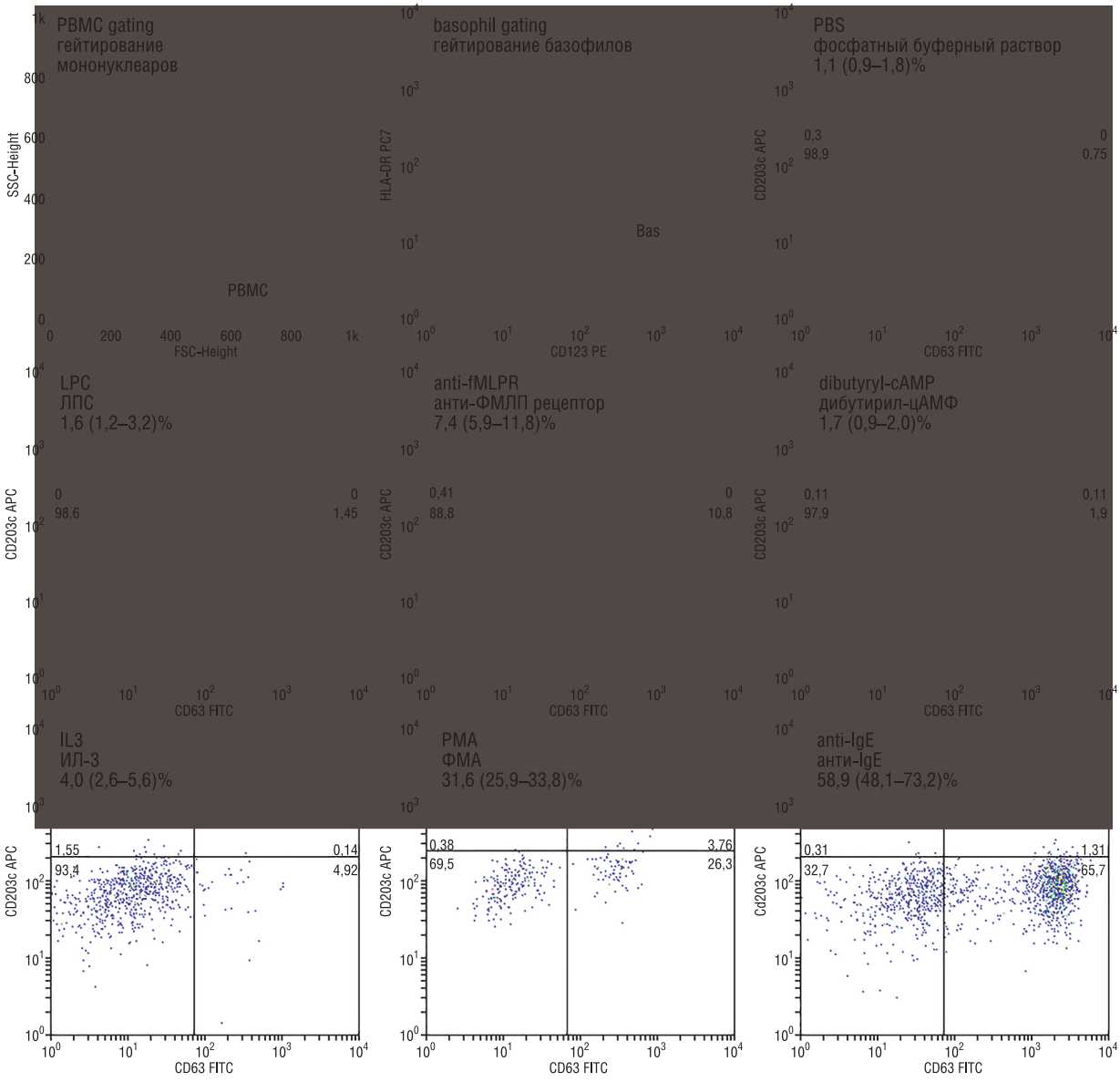


Рис. 1. Влияние различных веществ на активацию и дегрануляцию базофилов

Fig. 1. Effect of various substances on basophils activation and degranulation

раздражители опосредуются наличием множества рецепторов на поверхности клеток. Нами проведена оценка экспрессии ряда молекул, относящихся к разным функциональным классам, на поверхности неактивированных базофилов с целью выявления перспективных маркеров активации базофилов. Полученные показатели экспрессии молекул базофилами представлены в табл. 1. С целью оценки потенциала использования выбранных молекул в качестве маркеров активации и дегрануляции базофилов последние активировали моноклональным антителом к IgE. Степень изменения экспрессии молекул оценивали путем расчета индекса активации (ИА), представляющего собой соотношение значения экспрессии в положительном контроле к ее значению в отрицательном контроле. На рис. 2 наглядно представлена степень изменения экспрессии молекул CD63, CD107a, CD69, CD13, CD164, CD11b, CD300a и CD203c, достоверно усиливающуюся под действием IgE. Учитывая довольно высокий процент экспрессии некоторых молекул на базофилах в нативном состоянии, на рис. 2 представлен график, отражающий ИА маркеров.

Одной из ключевых функций базофилов является выброс вазоактивных веществ, содержащихся в многочисленных внутриклеточных гранулах базофилов, что в свою очередь обусловли-

Таблица 1. **Показатели экспрессии молекул на неактивированных базофилах**
Table 1. **The expression of molecules on non-activated basophils**

Молекула	Функциональный класс	Показатель экспрессии, % (Me 25–75 %)	Индекс активации
CD11b	Интегрин альфа-М, рецептор к iC3b	94,1 (88,31–100,00)	1,71 (1,61–1,93)
CD11c	Интегрин альфа-Х, рецептор для фибриногена	37,12 (33,53–43,57)	0,85 (0,31–1,64)
CD13	Аминопептидаза N	82,35 (76,40–94,37)	88,9 (81,2–100,00)
CD15	Молекула адгезии, Lewis X	6,47 (5,24–8,16)	0,67 (0,22–0,98)
CD16	Fc-гамма-RIII	14,30 (12,10–17,81)	0,34 (0,21–0,46)
CD32	Fc-гамма-RII	74,13 (70,00–77,39)	1,16 (1,00–1,95)
CD33	Молекула адгезии, рецептор к сиаловой кислоте	75,35 (62,32–82,38)	1,15 (0,64–1,23)
CD35	Рецептор к комплементу, CR1	88,70 (84,11–91,62)	1,17 (1,84–1,36)
CD40	Костимуляторный рецептор, надсемейство ФНО	11,18 (9,34–14,12)	0,30 (0,21–0,56)
CD43	Лейкосиалин (сиалофорин)	70,20 (61,35–79,11)	0,8 (0,58–1,10)
CD54	Молекула клеточной адгезии, ICAM-1	7,87 (5,48–9,10)	0,07 (0,04–0,11)
CD55	Фактор ускорения распада комплемента, DAF	93,12 (84,74–98,75)	1,06 (0,84–1,25)
CD62L	Молекула клеточной адгезии, L-селектин	90,64 (84,76–97,68)	1,10 (0,72–1,36)
CD63	LAMP-семейство, LAMP-3	1,46 (1,31–2,72)	41,4 (19,04–47,31)
CD68	LAMP-семейство	0,55 (0,15–1,14)	0,00
CD69	Семейство лектинов С типа	3,52 (2,80–4,86)	2,13 (1,34–2,60)
CD73	5′-эктонуклеотидаза	5,22 (4,57–7,33)	0,00
CD88	Рецептор к комплементу, C5AR1	0,59 (0,33–1,40)	1,46 (1,25–1,98)
CD95	Fas-рецептор (APO-1)	3,17 (2,46–5,24)	0,67 (0,44–0,78)
CD105	Эндоглин	3,85 (2,41–6,27)	1,00 (0,81–1,15)
CD106	Молекула клеточной адгезии, VCAM-1	0,73 (0,40–3,61)	1,48 (1,27–1,89)
CD107a	LAMP-семейство, LAMP-1	2,58 (1,86–6,45)	13,32 (6,54–26,40)
CD161	Семейство лектинов С типа, NKRP1	6,35 (4,33–7,98)	0,49 (0,27–1,11)
CD164	Молекула клеточной адгезии, эндолин	5,33 (3,00–6,45)	9,40 (8,42–13,73)
CD195	С-С рецептор хемокина 5 (CCR5)	5,15 (3,89–7,14)	0,51 (0,32–0,96)
CD197	С-С рецептор хемокина 5 (CCR5)	12,04 (9,76–14,38)	0,14 (0,00–0,33)
CD205	Рецептор эндоцитоза	2,01 (1,18–3,47)	1,00 (0,78–1,36)
CD282	Толл-подобный рецептор 2 (TLR2)	2,01 (1,40–3,15)	0,88 (0,63–1,12)
CD284	Толл-подобный рецептор 4 (TLR4)	1,56 (0,49–3,51)	1,12 (0,90–1,43)
CD300a	Ингибиторный рецептор	100	1,00

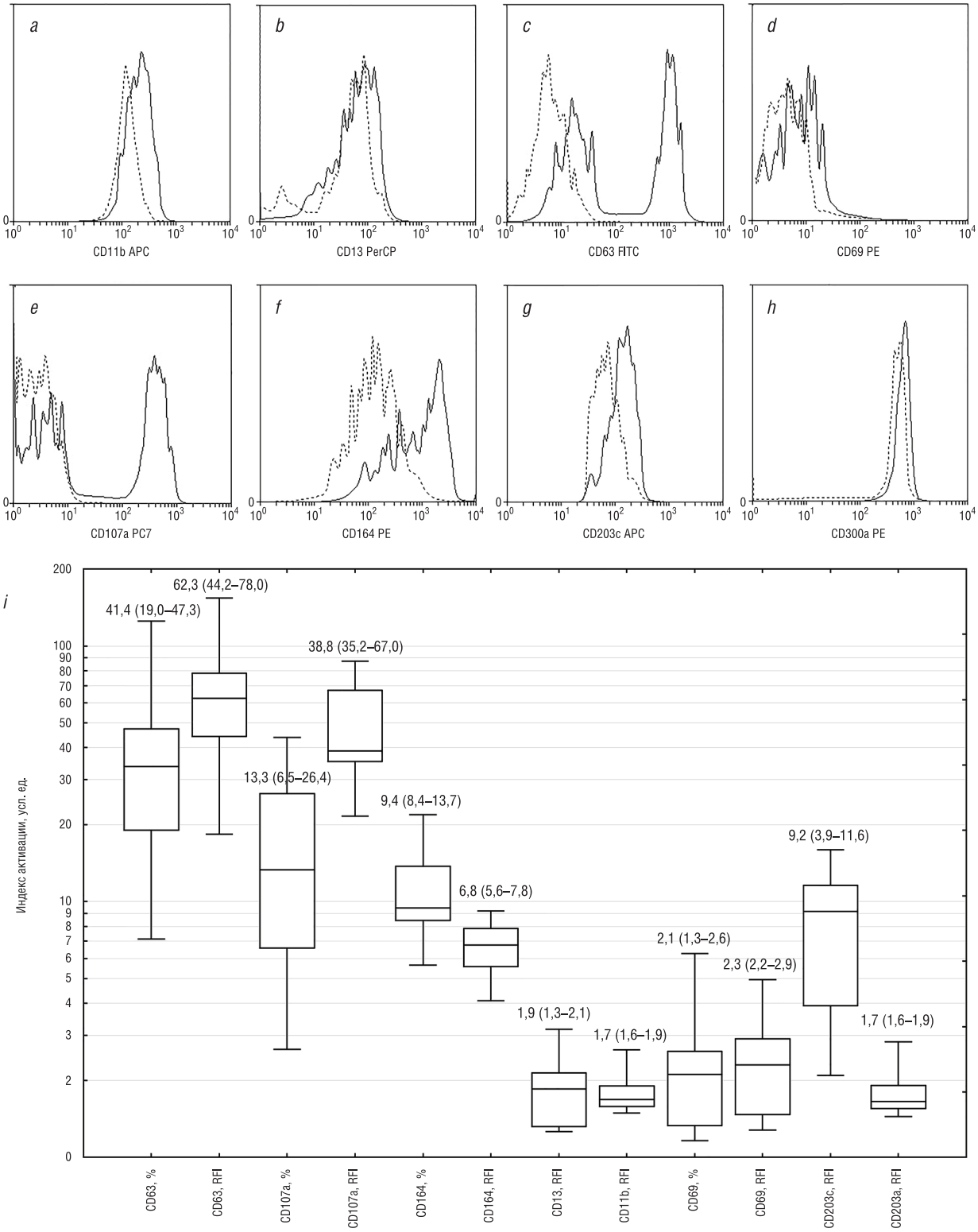


Рис. 2. Экспрессия молекул на базофилах под действием IgE: *a*, *b*, *c*, *d*, *e*, *f*, *g*, *h* – гистограммы маркеров активации базофилов CD11b, CD13, CD63, CD69, CD107a, CD164, CD203c, CD300a соответственно, где непрерывной линией обозначена экспрессия под влиянием IgE, пунктирной – отрицательный контроль; *i* – значения индекса активации молекул, усиливающих экспрессию на базофилах под влиянием IgE

Fig. 2. Expression of basophil molecules induced by the IgE activation: *a*, *b*, *c*, *d*, *e*, *f*, *g*, *h* – histograms of basophil activation markers CD11b, CD13, CD63, CD69, CD107a, CD164, CD203c, CD300a respectively. The continuous line indicates the expression by the IgE activation; the dotted line stands for the negative control; *i* – activation index for basophil molecules that enhance the expression on basophils due to the anti-IgE stimulation

вает развитие клинических симптомов аллергической реакции. На мембране лизосом базофилов экспрессируется ряд ассоциированных с лизосомами молекул (семейство LAMP): CD68, CD107a (LAMP-1), CD107b (LAMP-2) и CD63 (LAMP-3). Наибольшее внимание было уделено двум молекулам – CD63 и CD107a, что обусловлено их невысоким содержанием на поверхности нативных базофилов и резким усилением их экспрессии после активации, что непосредственно отражает процесс дегрануляции базофилов. Установлено, что оба маркера дегрануляции базофилов (CD63 и CD107a), относящиеся в LAMP-семейству, характеризуются схожим характером экспрессии под действием IgE. К преимуществам использования этих молекул в качестве маркеров дегрануляции относится высокий индекс разделения популяций, превышающий в большинстве случаев 10 усл. ед. Это говорит о том, что дегранулировавшие базофилы можно корректно выделить на цитограммах флуоресценции (рис. 2).

Молекула CD203 экспрессируется на базофилах периферической крови, тучных клетках, а также их $CD34^+$ предшественниках [18]. Несмотря на 100 %-ную экспрессию нативными базофилами, экспрессия молекулы CD203c на мембране клеток после специфической стимуляции аллергеном значительно возрастает [19]. Ряд исследователей указывают на более высокую чувствительность маркера CD203c в сравнении с использованием молекулы CD63 для диагностики аллергии на яды насекомых [20], кошачью шерсть [21] и амоксициллин [22]. Нами установлено достоверное повышение интенсивности экспрессии молекулы CD203c при активации базофилов ($p = 0{,}0002$).

Молекула CD164, помимо базофилов, экспрессируется преимущественно на гемопоэтических стволовых клетках (ГСК), и основной функцией этой молекулы считается угнетение пролиферации последних [23]. Роль молекулы в аллергических реакциях до конца не изучена, однако в ряде работ указывается на значимое усиление экспрессии при специфической активации базофилов [24]. Экспрессия на нативных базофилах довольно низкая (5,33 (3,00–6,45) %), при этом под воздействием анти-IgE значения экспрессии молекулы CD164 сопоставимы с ее значениями для маркера дегрануляции CD63 (51,5 (31,6–60,0) %).

Поверхностная молекула CD13, аминопептидаза N, присутствует на большинстве миелоидных клеток, включая базофилы. Результаты изучения эффективности использования данной молекулы в тесте активации базофилов представлены лишь в единичных работах, при этом при проведении данных исследований применялись лишь рекомбинантные аллергены [15, 25]. Нами установлено, что конститутивная экспрессия молекулы CD13 на неактивированных базофилах достаточно высокая (82,35 (76,40–94,37) %), следовательно, необходимо оценивать изменение ее интенсивности экспрессии в процессе активации базофилов.

Полученные данные по экспрессии молекулы CD11b, относящейся к семейству интегринов, представляют особый интерес, учитывая достоверное повышение интенсивности экспрессии при IgE-опосредованной активации базофилов. В литературе упоминается только одно исследование со схожими результатами [26]. Молекула CD69 первоначально была охарактеризована как ранний маркер активации лимфоцитов, после чего было показано, что CD69 определяется также на других активированных клетках, включая нейтрофилы, моноциты, эозинофилы. На неактивированных базофилах отмечается незначительная экспрессия данной молекулы, тогда как при активации наблюдается достоверное ее повышение, в том числе интенсивности экспрессии. Особый интерес представляет ингибиторный рецептор CD300a, который экспрессируется на большинстве миелоидных клеток, включая базофилы [27]. При активации последних наблюдается значительное усиление интенсивности экспрессии, однако место данной молекулы в диагностике реакций гиперчувствительности предстоит еще установить.

Согласно результатам проведенных экспериментов, наиболее перспективными для использования в лабораторной диагностике аллергии являются маркеры дегрануляции CD107a и CD63, а также маркеры активации CD164, CD13, CD11b, CD69, CD203c, CD300a. Несмотря на умеренное увеличение интенсивности экспрессии под влиянием активации базофилов, вышеперечисленные маркеры могут быть использованы для проведения ТАБ для усиления чувствительности и диагностической эффективности метода в целом (табл. 2).

Таблица 2. **Значения маркеров активации и дегрануляции базофилов в нативном и активированном состояниях**

Table 2. **Expression of activation and degranulation markers on native and activated basophils**

Маркер	Отрицательный контроль		Положительный контроль		*p*	
	%	RFI	%	RFI	%	RFI
CD63	1,5 (1,3–2,7)	6,5 (3,7–9,6)	58,4 (49,6–64,3)	388,8 (243,5–521,4)	0,0002	0,0002
CD107a	2,6 (1,9–6,5)	3,9 (2,70–5,4)	42,1 (26,2–50,7)	164,1 (109,3–235,5)	0,0004	0,0002
CD164	5,3 (3,0–6,5)	47,6 (40,6–66,1)	51,5 (31,6–60,0)	347,0 (224,9–367,5)	0,0002	0,002
CD13	–	25,8 (19,8–30,1)	–	48,4 (32,9–59,1)	–	0,002
CD11b	–	23,8 (18,6–39,0)	–	51,7 (29,7–61,7)	–	0,007
CD69	3,5 (2,8–4,9)	3,71 (2,60–4,37)	7,3 (5,9–9,1)	8,7 (5,6–11,3)	0,009	0,0003
CD203c	–	4,0 (2,4–5,9)	–	27,0 (14,6–54,4)	–	0,0002
CD300a	–	230,1 (198,5–254,9)	–	396,1 (321,6–434,2)	–	0,0003

Заключение. В результате проведенного исследования нами оптимизированы условия постановки и учета теста активации базофилов для лабораторной диагностики IgE-опосредованной аллергии.

Показано, что сроки хранения образца периферической крови для постановки ТАБ не должны превышать 4 ч, а хранение и транспортировка должны осуществляться в условиях комнатной температуры (18–25 ºС). В идеале постановка ТАБ должна выполняться непосредственно в том же учреждении, в котором осуществляется забор крови.

При изучении влияния различных иммунотропных веществ на базофилы с целью их дальнейшего использования в качестве неспецифического положительного контроля активации базофилов установлено, что ИЛ-3, дибутирил-цАМФ и ЛПС грамотрицательных бактерий обладают слабыми стимулирующими свойствами в отношении базофилов. Антитело к fMLPR вызывало умеренную активацию базофилов, но, тем не менее, недостаточную для использования в качестве положительного контроля. ФМА приводит к значительной активации клеток с увеличением интенсивности экспрессии CD203c и легко выявляемой дегрануляцией базофилов, определяемой по маркеру CD63. С целью оценки специфического ответа базофилов выбрано антитело к IgE. Таким образом, в качестве положительных контролей нами предлагается использовать ФМА в концентрации 2 нг/мл и антитело к IgE в концентрации 1 мгк/мл.

Скрининг молекул, экспрессируемых базофилами при воздействии антитела к IgE, с целью поиска потенциальных маркеров активации для постановки ТАБ показал, что оба маркера дегрануляции базофилов (CD63 и CD107a), относящиеся к LAMP-семейству, характеризуются схожим характером экспрессии под действием антитела к IgE. Такие молекулы, как CD11b, CD13, CD69, CD164 и CD300a, относящиеся к разным функциональным классам и усиливающие свою экспрессию с помощью базофилов под действием стимулов, могут быть использованы в качестве дополнительных маркеров для усиления диагностической эффективности ТАБ.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Sainte-Laudy, J. Analysis of membrane expression of the CD63 human basophil activation marker. Applications to allergologic diagnosis / J. Sainte-Laudy, C. Vallon, J. C. Guérin // Allerg. Immunol. (Paris). – 1994. – Vol. 26, N 6. – P. 211–214.

2. Monitoring human basophil activation via CD63 monoclonal antibody / E. F. Knol [et al.] // J. Allergy Clin. Immunol. – 1991. – Vol. 88, N 3, pt. 1. – P. 328–338.

3. CD63 antigen. A novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eukaryotic cell / M. J. Metzelaar [et al.] // J. Biol. Chem. – 1991. – Vol. 266, N 5. – P. 3239–3245.

4. Diagnostic tests based on human basophils: more potentials and perspectives than pitfalls. II. Technical issues / A. L. De Week [et al.] // J. Investig. Allergol. Clin. Immunol. – 2008. – Vol. 18, N 3. – P. 143–155.

5. CD203c-based basophil activation test in allergy diagnosis: Characteristics and differences to CD63 upregulation / E. M. Sturm [et al.] // Cytometry. Part B, Clin. Cytom. – 2010. – Vol. 78, N 5. – P. 308–318.

6. Identification of CD13, CD107a, and CD164 as novel basophil-activation markers and dissection of two response patterns in time kinetics of IgE-dependent upregulation / F. Hennersdorf [et al.] // Cell Res. – 2005. – Vol. 15, N 5. – P. 325–335.

7. Романова, И.В. Оптимизация алгоритма гейтирования базофилов на проточном цитометре: многоцветный анализ / И.В. Романова, А.Е. Гончаров, Н.И. Дударева // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2016. – №4. – С. 15–24.

8. Biomarkers for monitoring clinical efficacy of allergen immunotherapy for allergic rhinoconjunctivitis and allergic asthma: an EAACI Position Paper / M.H. Shamji [et al.] // Allergy. – 2017. – Vol. 72, N 8. – P. 1156–1173.

9. Weasel for flow cytometry [Electronic resource] // Frank Battye – Flow Cytometry Consulting. – Mode of access: http://www.frankbattye.com.au/Weasel/index.html. – Date of access: 19.06.2016.

10. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica / О.Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2006. – 312 с.

11. A guide to modern statistical analysis of immunological data [Electronic resource] / B. Genser [et al.] // BMC Immunol. – 2007. – Vol. 8, N 27. – Mode of access: http://www.biomedcentral.com/1471–2172/8/27. – Date of access: 19.06.2016.

12. CD203c-based basophil activation test in allergy diagnosis: characteristics and differences to CD63 upregulation / E.M. Sturm [et al.] // Cytometry B Clin. Cytom. – 2010. – Vol. 78B, N 5. – P. 308–318.

13. Schroeder, J.T. Human basophils secrete IL-3: evidence of autocrine priming for phenotypic and functional responses in allergic disease / J.T. Schroeder, K.L. Chichester, A.P. Bieneman // J. Immunol. – 2009. – Vol. 182, N 4. – P. 2432–2438.

14. Urokinase induces basophil chemotaxis through a urokinase receptor epitope that is an endogenous ligand for formyl peptide receptor-like 1 and -like 2 / A. de Paulis [et al.] // J. Immunol. – 2004. – Vol. 173, N 9. – P. 5739–5748.

15. Identification of a new subset of myeloid suppressor cells in peripheral blood of melanoma patients with modulation by a granulocyte-macrophage colony-stimulation factor-based antitumor vaccine / P. Filipazzi [et al.] //J. Clin. Oncol. – 2007. – Vol. 25, N 18. – P. 2546–2553.

16. Rapamycin inhibits differentiation of Th17 cells and promotes generation of FoxP3+ T regulatory cells / H. Kopf [et al.] // Int. Immunopharmacol. – 2007. – Vol. 7, N 13. – P. 1819–1824.

17. Flow-assisted allergy diagnosis: current application and future perspectives / D.G. Ebo [et al.] // Allergy. – 2006. – Vol. 61, N 9. – P. 1028–1039.

18. The basophil activation marker defined by antibody 97A6 is identical to the ectonucleotide pyrophosphatase / phosphodiesterase 3 / H.J. Buhring [et al.] // Blood. – 2001. – Vol. 97. – P. 3303–3305.

19. Hymenoptera venom-induced upregulation of the basophil activation marker ecto-nucleotide pyrophosphatase / phosphodiesterase 3 in sensitized individuals / I.J. Platz [et al.] // Int. Arch. Allergy Immunol. – 2001. – Vol. 126. – P. 335–342.

20. Comparison of basophil activation tests using CD63 or CD203c expression in patients with insect venom allergy / B. Eberlein-König [et al.] // Allergy. – 2006. – Vol. 61, N 9. – P. 1084–1085.

21. Flow cytometry for basophil activation markers: The measurement of CD203c up-regulation is as reliable as CD63 expression in the diagnosis of cat allergy / A. Ocmant [et al.] // J. Immunol. Methods. – 2007. – Vol. 320. – P. 40–48.

22. Comparison of two basophil activation markers CD63 and CD203c in the diagnosis of amoxicillin allergy / N. Abuaf [et al.] // Clin. Exp. Allergy. – 2008. – Vol. 38, N 6. – P. 921–928.

23. The sialomucin CD164 (MGC-24v) is an adhesive glycoprotein expressed by human hematopoietic progenitors and bone marrow stromal cells that serves as a potent negative regulator of hematopoiesis / A.C. Zannettino [et al.] // Blood. – 1998. – Vol. 92, N 8. – P. 2613–2628.

24. Wolanczyk-Medrala A. CD164 as a basophil activation marker / A. Wolanczyk-Medrala, W. Barg, W. Medrala // Curr. Pharm. Des. – 2011. – Vol. 17, N 34. – P. 3786–3796.

25. Recombinant allergens promote expression of aminopeptidase-n (CD13) on basophils in allergic patients / K. Sonneck [et al.] // Int. J. Immunopathol. Pharmacol. – 2008. – Vol. 21, N 1. – P. 11–21.

26. Bochner, B.S. Altered surface expression of CD11 and Leu 8 during human basophil degranulation. / B.S. Bochner, S.A. Sterbinsky // J. Immunol. – 1991. – Vol. 146, N 7. – P. 2367–2373.

27. Sabato, V. Human basophils express the inhibitory receptor CD300a (IRp60) / V. Sabato [et al.] // J. Allergy Clin. Immunol. – 2011. – Vol. 127, N 2. – P. AB75.

References

1. Sainte-Laudy J., Vallon C., Guérin J. C. Analysis of membrane expression of the CD63 human basophil activation marker. Applications to allergologic diagnosis. *Allergie et Immunologie* (Paris), 1994, vol. 26, no. 6, pp. 211–214.

2. Knol E. F., Mul F. P., Jansen H., Calafat J., Roos D. Monitoring human basophil activation via CD63 monoclonal antibody. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 1991, vol. 88, no. 3, pt. 1, pp. 328–338. DOI: 10.1016/0091–6749(91)90094–5

3. Metzelaar M. J., Wijngaard P. L., Peters P. J., Sixma J. J., Nieuwenhuis H. K., Clevers H. C. CD63 antigen. A novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eukaryotic cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 1991, vol. 266, no. 5, pp. 3239–3245.

4. De Week, A. L., Sanz M. L., Gamboa P. M., Aberer W., Bienvenu J., Blanca M., Demoly P., Ebo D. G., Mayorga L., Monneret G., Sainte Laudy J. Diagnostic tests based on human basophils: more potentials and perspectives than pitfalls. II. Technical issues. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 2008, vol. 18, no. 3, pp. 143–155.

5. Sturm E. M., Kranzelbinder B., Heinemann A., Groselj-Strele A., Aberer W., Sturm G. J. CD203c-based basophil activation test in allergy diagnosis: characteristics and differences to CD63 upregulation. *Cytometry Part B, Clinical Cytometry*, 2010, vol. 78, no. 5, pp. 308–318. DOI: 10.1002/cyto.b.20526

6. Hennersdorf F., Florian S., Jakob A., Baumgärtner K., Sonneck K., Nordheim A., Biedermann T., Valent P., Bühring H. J. 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 Research*, 2005, vol. 15, no. 5, pp. 325–335. DOI:10.1038/sj.cr.7290301

7. Ramanava I. U., Goncharov A. E., Dudareva N. I. Optimization of basophil gating algoruthm on flow cytometry: multicolor analysis. *Vestsi Natsyianal'nai akademii navuk Belarusi. Seryia medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2016, no. 4, pp. 15–24 (in Russian).

8. Shamji M. H., Kappen J. H., Akdis M., Jensen-Jarolim E., Knol E. F., Kleine-Tebbe J., Bohle B., Chaker A. M., Till S. J., Valenta R., Poulsen L. K., Calderon M. A., Demoly P., Pfaar O., Jacobsen L., Durham S. R., Schmidt-Weber C. B. Biomarkers for monitoring clinical efficacy of allergen immunotherapy for allergic rhinoconjunctivitis and allergic asthma: an EAACI Position Paper. *Allergy*, 2017, vol. 72, no. 8, pp. 1156–1173. DOI: 10.1111/all.13138

9. Weasel for display and analysis of flow cytometry data. *Frank Battye – Flow Cytometry Consulting*. Available at: http://www.frankbattye.com.au/Weasel/index.html (accessed 19 June 2016).

10. Rebrova, O. Iu. Statistical analysis of medical data. Application of the Statistica software package. Moscow, MediaSfera Publ., 2006. 312 p. (in Russian).

11. Genser B., Cooper P. J, Yazdanbakhsh M., Barreto M. L., Rodrigues L. C. A guide to modern statistical analysis of immunological data. *BMC Immunology*, 2007, vol. 8, no. 27. Available at: http://www.biomedcentral.com/1471–2172/8/27 (accessed 19 June 2016).

12. Sturm E. M., Kranzelbinder B., Heinemann A., Groselj-Strele A., Aberer W., Sturm G. J. CD203c-based basophil activation test in allergy diagnosis: characteristics and differences to CD63 upregulation. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 2010, vol. 78, no. 5, pp. 308–318. DOI: 10.1002/cyto.b.20526

13. Schroeder J. T., Chichester K. L., Bieneman A. P. Human basophils secrete IL-3: evidence of autocrine priming for phenotypic and functional responses in allergic disease. *The Journal of Immunology*, 2009, vol. 182, no. 4, pp. 2432–2438. DOI: 10.4049/jimmunol.0801782

14. De Paulis A., Montuori N., Prevete N., Fiorentino I., Rossi F. W., Visconte V., Rossi G., Marone G., Ragno P. Urokinase induces basophil chemotaxis through a urokinase receptor epitope that is an endogenous ligand for formyl peptide receptor-like 1 and -like 2. *The Journal of Immunology*, 2004, vol. 173, no. 9, pp. 5739–5748.

15. Filipazzi P., Valenti R., Huber V., Pilla L., Canese P., Iero M., Castelli C., Mariani L., Parmiani G., Rivoltini L. Identification of a new subset of myeloid suppressor cells in peripheral blood of melanoma patients with modulation by a granulocyte-macrophage colony-stimulation factor-based antitumor vaccine. *Journal of Clinical Oncology*, 2007, vol. 25, no. 18, pp. 2546–2553.

16. Kopf H., de la Rosa G. M., Howard O. M., Chen X. Rapamycin inhibits differentiation of Th17 cells and promotes generation of FoxP3+ T regulatory cells. *International Immunopharmacology*, 2007, vol. 7, no. 13, pp. 1819–1824. DOI: 10.1016/j.intimp.2007.08.027

17. Ebo D. G., Sainte-Laudy J., Bridts C. H., Mertens C. H., Hagendorens M. M., Schuerwegh A. J., De Clerck L. S., Stevens W. J. Flow-assisted allergy diagnosis: current applications and future perspectives. *Allergy*, 2006, vol. 61, no. 9, pp. 1028–1039.

18. Bühring H. J., Seiffert M., Giesert C., Marxer A., Kanz L., Valent P., Sano K. The basophil activation marker defined by antibody 97A6 is identical to the ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3. *Blood*, 2001, vol. 97, no. 10, pp. 3303–3305.

19. Platz I. J., Binder M., Marxer A., Lischka G., Valent P., Bühring H. J. Hymenoptera-venom-induced upregulation of the basophil activation marker ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3 in sensitized individuals. *International Archives of Allergy and Immunology*, 2001, vol. 126, pp. 335–342. DOI: 10.1159/000049531

20. Eberlein-König 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, vol. 61, no. 9, pp. 1084–1085. DOI: 10.1111/j.1398–9995.2006.01122.x

21. Ocmant A., Peignois Y., Mulier S., Hanssens L., Michils A., Schandené 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. *Journal of Immunological Methods*, 2007, vol. 320, pp. 40–48. DOI: 10.1016/j.jim.2006.12.002

22. Abuaf N., Rostane H., Rajoely B., Gaouar H., Autegarden J.E., Leynadier F., Girot R. Comparison of two basophil activation markers CD63 and CD203c in the diagnosis of amoxicillin allergy. *Clinical and Experimental Allergy*, 2008, vol. 38, no. 6, pp. 921–928. DOI: 10.1111/j.1365–2222.2008.02960.x

23. Zannettino A. C., Bühring H. J., Niutta S., Watt S. M., Benton M. A., Simmons P. J. The sialomucin CD164 (MGC-24v) is an adhesive glycoprotein expressed by human hematopoietic progenitors and bone marrow stromal cells that serves as a potent negative regulator of hematopoiesis. *Blood*, 1998, vol. 92, no. 8, pp. 2613–2628.

24. Wolanczyk-Medrala A., Barg W., Medrala W. CD164 as a basophil activation marker. *Current Pharmaceutical Design*, 2011, vol. 17, no. 34, pp. 3786–3796.

25. Sonneck K., Baumgartner C., Rebuzzi L., Marth K., Chen K. W., Hauswirth A. W., Florian S., Vrtala S., Bühring H. J., Valenta R., Valent P. Recombinant allergens promote expression of aminopeptidase-n (CD13) on basophils in allergic patients. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 2008, vol. 21, no. 1, pp. 11–21. DOI: 10.1177/039463200802100103

26. Bochner B. S., Sterbinsky S. A. Altered surface expression of CD11 and Leu 8 during human basophil degranulation. *The Journal of Immunology*, 1991, vol. 146, no. 7, pp. 2367–2373.

27. Sabato V., Verweij M., Bridts C., De Clerck L., Stevens W., Schiavino D., Ebo D. Human basophils express the inhibitory receptor CD300a (IRp60). *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2011, vol. 127, no. 2, p. AB75. DOI: 10.1016/j.jaci.2010.12.310

Информация об авторах

Романова Ирина Владимировна – науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: romanovairavlad@gmail.com.

Гончаров Андрей Евгеньевич – канд. мед. наук, заведующий лабораторией. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: andrei.hancharou@gmail.com.

Дударева Наталья Ивановна – канд. мед. наук, заведующий отделением. 10-я городская клиническая больница (ул. Уборевича, 73, 220096, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: lpu10gkb@rambler.ru.

Information about the authors

Iryna U. Ramanava – Researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23 Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: romanovairavlad@gmail.com.

Andrei Y. Hancharou – Ph. D. (Med.), Head of the Laboratory. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: andrei.hancharou@gmail.com.

Natalia I. Dudarava – Ph. D. (Med.), Head of the Department. 10th City Clinical Hospital (73, Uborevich Str., 220096, Minsk, Republic of Belarus Belarus). E-mail: lpu10gkb@rambler.ru.