

УДК 616.517-07-085

В. Д. Бабаджан¹, Л. В. Кузнецова², П. Г. Кравчун¹, Н. Г. Риндіна¹¹Харківський національний медичний університет;²Національна академія післядипломної освіти ім. П.Л. Шупика, м. Київ

Лабораторна діагностика медикаментозної алергії

Частина 2. Методики визначення активації клітин алергенами до ліків

Ключові слова: *in vitro*-діагностики медикаментозної алергії, тест активації базофілів, тест антигенної стимуляції клітин, тест трансформації лімфоцитів, тест визначення підвищеної регуляції рецепторів CD69.

У зв'язку з успіхами фармакології та створенням великої кількості нових лікарських засобів застосування і зловживання медикаментами зростає [1, 5]. Збільшення алергопатології серед населення, пов'язане з різким підвищенням кількості ліків, що призначаються хворим, а також зі зміною реактивності організму, що призводить до росту ускладнень терапії, у тому числі алергічних реакцій на медикаменти [25]. Нині у 6 % хворих, що знаходяться на стаціонарному лікуванні, відзначаються певні побічні реакції на медикаменти. При цьому істинні алергічні реакції на медикаменти виявлено у 66 % хворих, а псевдоалергічні реакції – у 34 % із вказаного числа хворих [25].

Більшість лікарських засобів – це прості органічні речовини з низькою молекулярною масою (менше 1000 D) [21]. Нерідко початковий лікарський засіб не є імуногенним, оскільки не зв'язується з білками досить стійким ковалентним зв'язком [29]. Імуногенний потенціал таких ліків часто визначається одним або кількома метаболітами, які у вигляді гаптену зв'язуються з різними білками організму. По мірі збільшення молекулярної маси і складності структури молекули здатність індукувати імунну відповідь у ліків зростає. Високомолекулярні лікарські засоби (гетерологічні сироватки, стрептокіназа, інсулін) відносяться до повноцінних алергенів. Алергічні реакції на пептиди і білки найчастіше опосередковані IgE-антитілами або імунними комплексами. Проте механізм розвитку алергічних реакцій також може бути змішаним [3, 7].

Крім того, специфічна хімічна структура відповідальна за перехресну чутливість, яка в одних випадках

може бути пов'язана з елементами ядра, а в інших – може визначатися тільки специфічністю бічних ланцюгів [28]. Наприклад, вважають, що частота перехресних реакцій на цефалоспорици при алергії на пеніциліни не дуже висока [9], оскільки ядра тих і інших – різні. Проте в літературі описано випадки перехресної гіперчутливості [8] на ці антибіотики, що може залежати від будови бічних ланцюгів. Тому на ведені відомості необхідно враховувати при призначенні лікарського засобу [6].

Шкірні тести для діагностики медикаментозної алергії негайного типу далеко не завжди можуть бути використані, для їх проведення існує досить багато протипоказань і достовірність цих тестів відносно невисока через те, що причиною виникнення алергічної реакції часто є не сам початковий медикамент, а його метаболіти [21, 36]. Тому для діагностики медикаментозної алергії разом зі шкірними пробами застосовують лабораторні тести [22].

Проте абсолютно достовірних тестів для діагностики медикаментозної алергії *in vitro* не існує, тому дослідники удосконалюють вже наявні методики і створюють нові тести. У зв'язку з цим для діагностики медикаментозної алергії розробляються тести, в основі яких лежить активація клітин алергенами [23]. Перевагою цих тестів є відсутність необхідності використання специфічних IgE та IgG до досліджуваних лікарських препаратів. Обмеженням інформативності цих тестів є однотипність результатів тесту як при алергічній, так і при псевдоалергічній реакції на препарат. Раніше подібну реактивність виявляли в тестах ушкодження

лейкоцитів і стимуляції виділення гістаміну базофілами. Прикладом подібного тіста є прямий тест дегрануляції базофілів.

Прямий тест дегрануляції базофілів (ТДБ) дозволяє визначати антитіла, пов'язані з лейкоцитами. ТДБ заснований на дегрануляції базофілів хворих на алергію, сенсibilізованих антитілами класу IgE під впливом специфічного алергену [2].

Тест дегрануляції базофілів виконується таким чином. Натще у хворого отримують 10–15 мл (1 мл – 1 алерген) крові з вени в пробірку з гепарином (20 ОД/мл). Кров відстоюють протягом 30–45 хвилин. Плазму з лейкоцитами відсмоктують і центрифугують 3–5 хвилин при 500 об/хв. Супернатант видаляють, осад лейкоцитів ресуспендують у 0,5–1 мл фізіологічного розчину (до концентрації 5–10 млн клітин на 1 мл). В лунки планшета для імунологічних досліджень вносять по 0,05 мл суспензії лейкоцитів, в дослідні лунки – рівний об'єм алергенів, в контрольні – розчинник. Інкують 15 хвилин при температурі 37°C і додають в кожен лунку по 0,05 мл розчину толуїдинового синього. Розчин толуїдинового синього 0,025 % метакроматично забарвлює гранули базофілів. Цей розчин готують на 30 % етанолі, доводячи рН до 3,2–3,4 шляхом додавання крижаної оцтової кислоти (приблизно 3–4 мкл на 10 мл фарби). Потім суспензією заповнюють камеру Горяєва і підраховують кількість забарвлених базофілів. У контролі повинно міститися не менше 30 клітин. Реакція вважається позитивною, якщо число забарвлених клітин у досліді зменшувалася на 30 % і більше порівняно з контролем. У разі наявності 50 базофілів і більше в контролі тест позитивний при розходженні від нього на 20 % і більше. Ліки застосовують у концентраціях: новокаїн 2,5 мг/мл, анальгін 0,5 мг/мл, вітамін B₁ 1 мг/мл. На рисунку 1 представлено результати прямого тесту дегрануляції базофілів. Незважаючи на демонстративність тесту, у зв'язку з його низькою відтворюваністю у різних лабораторіях для стандартизації методу використовують проточну цитометрію.

Тест активації базофілів з використанням методу проточної цитометрії дозволяє виміряти *in vitro* рівень IgE-залежної відповіді на алергени у сенсibilізованих пацієнтів шляхом аналізу базофілів за допомогою проточної цитометрії. Активация базофілів у присутності алергену відбувається поетапно, починаючи зі змін усередині клітини (сигнальної трансдукції від FcεR1 за допомогою фосфорилування p38MAPK і припливу кальцію), подальшими змінами на клітинній мембрані (поява CD203c) і розвитком дегрануляції базофілів (CD63 на мембрані базофіла виявляється після злиття внутрішньоклітинних гранул з клітинною мембраною і вивільнення медіаторів) [14, 15].

Реагенти у складі набору дозволяють знайти відмінності між активованими базофілами і базофілами, що знаходяться у стані спокою, за допомогою проточної цитометрії. Для цієї мети використовується трибарвна комбінація антитіл, яка є сумішшю двоколірних мишачих моноклональних антитіл (CD203c-PE та

CD3-PC5) і одноколірних шурячих моноклональних антитіл (CRTh2-FITC). Серед лейкоцитів цільної крові здорових донорів клітинні рецептори CRTh2 експресуються на базофілах і еозинофілах, а також на Т-хелперах 2-го типу, які відповідають за розвиток гуморального імунітету і алергічних реакцій [27]. Клітинний рецептор CRTh2 і рецептор простагландину D зв'язані з G-білками і обоє є рецепторами простагландину D2, проте при зв'язуванні їх з лігандом активуються різні внутрішньоклітинні сигнальні шляхи. Простагландин D2 є основним метаболітом арахідонової кислоти, який виробляється активованими алергеном мастоцитами і є ліпідним медіатором запалення при алергічних реакціях [24]. Моноклональні антитіла 97A6 розпізнають поверхневий антиген, який експресується виключно на базофілах периферичної крові людини і не експресується на інших клітинах крові [34]. Було доведено, що моноклональні антитіла 97A6 спрямовані проти CD203c [16]. Антиген CD3 експресується тільки на поверхні зрілих Т-лімфоцитів. Моноклональні антитіла UCHL1 взаємодіють з ε-ланцюгом комплексу CD3 [13].

Тест активації базофілів виконується таким чином. Базофіли експресують високоафінний рецептор IgE (FcεR1). В ролі позитивного контролю IgE-опосередкованої активації базофілів використовують антитіла до IgE, що містяться в реактиві і здатні розпізнавати IgE, пов'язані з рецепторами, та викликати активацію базофілів.

Розчин для активації є оптимізованим буфером з високим вмістом кальцію, який дозволяє активувати *in vitro* базофіли крові, зібраної в пробірці, з використанням як антикоагулянта етилендіамінтетраацетату (ЕДТА). Розчин для зупинки реакції виступає буфером з високим вмістом ЕДТА, який дозволяє зупинити процес активації базофілів *in vitro*.

Для аналізу зразка методом проточної цитометрії необхідно підготувати монодисперсну суспензію клітин та еліминувати еритроцити, що утруднюють аналіз. Основним компонентом лізуючого розчину є циклічний амін, який у присутності карбонангідази еритроцитів перетворюється на сполуку, здатну лізувати еритроцити.

Фіксувальний розчин дозволяє приготувати зразок цільної крові шляхом фіксації суспензії клітин в процесі лізису еритроцитів. Цей розчин використовують і для фіксації готової до аналізу проби.

Базофіли забарвлюють моноклональними антитілами у присутності алергену або контролю. Потім проводиться лізис еритроцитів і аналіз отриманих зразків на проточному цитофлуориметрі. Після виключення з області аналізу Т-лімфоцитів (як CD3-позитивних клітин) виконується аналіз базофілів за експресією CRTh2 та CD203c. Неактивовані базофіли (базофіли, що перебувають у стані спокою) виявляють за фенотипом CRTh2posCD203c dimCD3neg, тоді як активовані *in vitro* базофіли мають фенотип CRTh2posCD203c brightCD3neg.

При іншій модифікації методу визначають кількість активованих базофілів. Кількість активованих

базофілів визначають за рівнем експресії CD63 (рис. 2–4). Після стимуляції алергеном рівень експресії CD63 підвищується у 2–3 рази [15].

Активация базофілів специфічними алергенами

При контакті алергенів з молекулами IgE на базофілах і мастоцитах відбувається каскад ферментних реакцій, що призводить до дегрануляції та вивільнення медіаторів із гранул (гепарин, гістамін). Ці реакції зумовлюють також синтез і секрецію лейкотрієнів (ЛТ), цитокінів, медіаторів запалення, що викликають симптоми алергії. Лейкотрієни синтезуються також у разі псевдоалергічних реакцій, тобто реакцій, що проходять без участі IgE. При псевдоалергічних реакціях відбувається активация базофілів і неспецифічне вивільнення медіаторів (гістаміну, ЛТ, простагландинів) через тригерні механізми: активацию комплементу, IgG-опосередовану гіперчутливість, ауто-IgE-антитіла або через неімунні реакції (пряма активация базофілів).

Тест антигенної стимуляції клітин (Cellular Antigen Stimulation Test – CAST) є сучасним методом діагностики гіперчутливості негайного типу. Актуальність CAST пов'язана з необхідністю підтвердження неясних результатів шкірних тестів незалежним від використання специфічних IgE методом. Крім того, деякі види алергії (на лікарські засоби, харчові добавки) дуже погано виявляються шкірними тестами або серологічно (виявлення специфічних IgE – sIgE), для них достовірні лише небезпечні провокаційні тести [20]. Технологія CAST заснована на визначенні сульфидолейкотрієнів (сульфідоЛТ) LTC₄, LTD₄, LTE₄, що секретуються праймованими ІІ-3 базофілами під дією АлГ *in vitro*. Його також називають провокаційним тестом *in vitro*. Завдяки синтезу сульфидоЛТ (sLT) *de novo* аналіз CAST має високу специфічність порівняно з класичним тестом вивільнення гістаміну.

Як позитивний контроль для кожного зразка використовують моноклональні антитіла до високоафінного рецептора для IgE (FcεRI), що імітують зв'язування IgE-антитіл з рецептором на мембранах базофілів. Щоб отримати надійні та відтворювані результати, важливо правильно підібрати алергени для реакції та їх дозування, оскільки деякі з них здатні неспецифічно взаємодіяти з базофілами *in vitro* (ліки, харчові добавки тощо).

CAST виконується таким чином.

1. Виділення лейкоцитів крові:

а) до стабілізованої ЕДТА крові додають декстран для осадження еритроцитів;

б) надосадок центрифугують для осадження лейкоцитів (видалення декстрану і тромбоцитів);

в) осад лейкоцитів ресуспендують у буферному розчині.

2. Стимуляцію лейкоцитів здійснюють:

а) анти-FcεRI-антитілами (позитивний контроль);

б) фізіологічним розчином (негативний контроль);

в) алергеном(ами) в різних концентраціях.

3. Супернатанти відбирають і негайно визначають вміст сульфидоЛТ (LTC₄), виділених сенсibilізованими

лейкоцитами під впливом анти-FcεRI-антитіл та алергенів за допомогою твердофазного імуноферментного аналізу. Для кількісного визначення необхідно використовувати декілька розведень стандартів для побудови калібрувальної кривої.

4. Інтерпретація тесту. Для медикаментозних алергенів нижній (пороговий) рівень (cut off) – близько 40 пг/мл.

CAST не рекомендують як тести для первинного алергологічного обстеження, вони складніші, дорожчі та поступаються стандартним тестам виявлення специфічних IgE (UniCAP тощо).

Цитометричний варіант тесту антигенної стимуляції клітин – FLOW-CAST (FAST). Етапи виділення лімфоцитів і стимуляції алергеном для обох варіантів – імуноферментного і цитометричного – ідентичні. Проте замість sLT на третьому етапі FLOW-CAST визначає кількість активованих базофілів, що експресують на поверхні антиген CD63 (gp53) у відповідь на стимуляцію алергеном. Основні показання до застосування CAST/FAST: підозра на гіперчутливість негайного типу за медіаторним типом і відсутність специфічних IgE; наявність гіперчутливості до харчових добавок і медикаментозних алергенів; підозра на наявність псевдоалергічного механізму клінічних проявів; діагностика аспіринової астми і подібних станів.

Бета-лактамні антибіотики (пеніциліни, амоксициліни, ампіцилін, цефалоспорини), потрапивши в організм, формують кон'югати типу гаптен-транспортний білок, які можуть стимулювати імунну систему. Використання комбінації тестів *in vivo* та *in vitro* дозволяє ефективно і об'єктивно діагностувати клінічні реакції гіперчутливості негайного типу до β-лактамних антибіотиків. Бензилпеніцилін і його метаболіти ідентифікуються як головні антигени. Відомо, що визначення алергенспецифічних IgE має обмежене значення для цих алергенів, оскільки вони зникають протягом кількох тижнів або місяців після останнього введення лікарського препарату. Крім того, 25 % пацієнтів з алергією до β-лактамних антибіотиків мають негативні шкірні тести і результати визначення алергенспецифічних IgE. У третини цих пацієнтів можна ідентифікувати алергію тільки методом CAST/FAST – одним із небагатьох тестів *in vitro*, здатних виявити псевдоалергічну реакцію, характерну для багатьох лікарських сполук.

Для оцінки контрольованої стимуляції клітин імунної системи алергенами групи пеніциліну за допомогою методу CAST/FAST було створено комплекс бензилпеніцилін-полілізин (PPL), а для оцінки алергенності метаболітів бензилпеніциліну – підібрано суміш мінорних детермінант (MDM). Таким чином, при включенні в діагностичний алгоритм CAST/FAST у багатьох випадках стає можливим уникнути провокаційного теста *in vivo*. Чутливість цього методу для пеніциліну становить 70 %, специфічність – 100 %. Окрім бензилпеніциліну методом CAST/FAST можна виявити підвищену чутливість до амоксициліну.

Аспірин та інші нестероїдні протизапальні препарати (НПЗП) при їх повторних введеннях часто зумовлюють розвиток алергічних реакцій. Визначення алергенспецифічних IgE малоефективне, оскільки гіперчутливості до НПЗП має не-IgE-опосередкований характер. Встановлено, що класичні клітинні алергостести мають негативні результати для виявлення гіперчутливості до аспірину. Водночас, проведені дослідження показали, що аспірин/НПЗП можуть індукувати вивільнення sLT і дегрануляцію базофілів. Нині розроблено CAST/FAST для аспірину, диклофенаку і напроксену. Для аспірину чутливість методу сягає 63 %, специфічність – 93 %; для інгібіторів циклооксигенази-1 – 53 % та 89 % відповідно; для метамізолу (анальгін) чутливість CAST – 76 %, в комбінації з FLOW-CAST (FAST) – до 77 %.

Останніми роками збільшується кількість повідомлень про анафілактичні реакції під час проведення наркозу, опосередковані міорелаксантами. У зв'язку з цим розроблено CAST з міорелаксантами, його чутливість становить 54–90 %, специфічність – 100 %. У комбінації з шкірними тестами чутливість сягає 80 %, що знижує ризик для пацієнта і необхідність проведення провокаційних тестів *in vivo* [15].

Реакція бластотрансформації та стимуляції лімфоцитів (РБТЛ). У РБТЛ медикаментозна алергія виявляється у 60–70 % випадків при підвищеній чутливості негайного типу [4]. Завдяки цьому методу показано, що ліки можуть індукувати як CD4+, так і CD8+ Т-клітинну відповідь, а також препарат-специфічні Th1 і/або Th2 відповіді [30, 33]. Проте невисока частота позитивних реакцій, складність і тривалість постановки реакції (облік на 3–4-й день) роблять цей метод малопридатним для діагностики медикаментозної алергії [39].

Тест трансформації лімфоцитів (ТТЛ) дозволяє *in vitro* виявити алергію уповільненого типу на ліки за наявності сенсibilізації Т-лімфоцитів [18, 31]. При виконанні методики ТТЛ виділяють лімфоцити за допомогою фенол-верографічного градієнту. До Т-лімфоцитів додають розчини підозрюваних ліків у зростаючих концентраціях. Проводять інкубацію лімфоцитів з розчинами ліків протягом 6 діб. Сенсibilізацію Т-клітин виявляють за посиленням проліферації Т-лімфоцитів під впливом алергенів – РБТЛ з урахуванням бластів по збільшенню включення H^3 -тимідину в їх ДНК (рис. 5.) [32]. Недоліком методу є необхідність використовувати радіонукліди (H^3 -тимідин).

Тест трансформації лімфоцитів за розведенням ефіру сукцинімідил-карбоксифлуоресцеїн-діацетату (КФЦД). Методика заснована на проведенні рідинної цитометрії з фарбуванням проліферуючих Т-лімфоцитів за допомогою нерадіоактивної мітки – ефіру КФЦД [38]. КФЦД є мембранопроним барвником, який здатний зв'язувати аміногрупи цитоплазматичних білків. У період поділу клітин КФЦД-мічені білки однаково розподіляються між дочірніми клітинами, тим самим подвоюючи інтенсивність флуоресценції звичайних Т-клітин. Водночас флуоресценція антигенспецифічних Т-клітин зменшується.

Принцип тесту трансформації лімфоцитів за розведенням КФЦД полягає в наступному. Виділені за допомогою фікол-верографічного градієнта Т-клітини інкубують з КФЦД (у концентрації 5 мкМ) 10 хвилин при температурі 37°C та відмивають надлишок барвника. Після цього мічені Т-клітини культивують з потенційним алергеном (з лікарським препаратом, наприклад з фенітоїном, у концентрації 50 мкг/мл). Т-клітини розводять 5 % аутологічною плазмою до концентрації 1×10^6 кл/мл в присутності зволоженого 5 % CO_2 . Після 7 днів культивування в присутності зволоженого 5 % CO_2 Т-клітини повторно стимулюють потенційним алергеном (з лікарським препаратом, наприклад, з фенітоїном, у концентрації 50 мкг/мл) (рис. 6). Потім до Т-клітин додають форболовий ацетат меристата (50 нг/мл) та іономіцин (1 мкг/мл) в присутності брэфелдину (10 мкг/мл), інкубують розчин протягом 6 годин. Активация Т-клітин виникає при взаємодії клітинного поверхневого рецептора з молекулою його специфічного ліганда, що приводить до гідролізу інозитолфосфоліпідів у діацилгліцерол та інозитолфосфати під дією фосфоліпази С. Діацилгліцерол є алостеричним активатором протеїнкінази С та інозитол фосфатів, які стимулюють внутрішньоклітинне вивільнення іонів кальцію (Ca^{2+}), які, в свою чергу, активують клітинну відповідь Т-лімфоцитів, продукування ІЛ-2, що зумовлює активацию Т-клітин. Форболовий ацетат меристату, структурний аналог діацилгліцеролу, також активує протеїнкіназу С. У нормальних умовах росту ІЛ-2 не продукується клітинами чи продукується у незначній кількості. Форболовий ацетат меристату через активацию протеїнкінази С може активувати Т-клітини і стимулювати низький рівень продукції ІЛ-2. Коли форболовий ацетат меристату активує Т-клітини в присутності костимулятора, такого як фітогемаглютинін чи алерген, продукція ІЛ-2 значно зростає. Потім Т-клітини фарбують PG-5-міченими анти-CD4-антитілами за допомогою FIX & PERM cell permeabilization kits (Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA) і підраховують флуоресценцію.

Визначення активації Т-лімфоцитів за маркером підвищеної регуляції рецепторів CD69. Після активації лімфоцити експресують кілька молекул на своїй поверхні. Одним з цих маркерів є CD69, який виявляється в ранні терміни після активації клітин [26, 37]. А. Beeler та співавтори [11] оцінили діагностичну корисність CD69 у 15 пацієнтів з реакціями гіперчутливості уповільненого типу і встановили, що у випадках позитивного тесту активації Т-лімфоцитів спостерігалось підвищення CD69 на Т-клітинах через 48 годин після їх стимуляції препаратами, залученими до алергічної реакції. У цьому самому дослідженні показано, що підвищена регуляція CD69 Т-клітин після стимуляції препаратом набагато вище, ніж кількість проліферуючих Т-клітин, що була виявлена за допомогою фарбування Т-лімфоцитів ефіром КФЦД. Подальший аналіз показав, що препарати стимулюють тільки специфічні до них Т-клітини, відповідальні за підвищену секрецію

ІЛ-2 та експресію CD69 [11]. Обмеженням цього методу є те, що деякі препарати можуть викликати активацію CD69 Т-лімфоцитів навіть за відсутності специфічного розпізнавання ними лікарського засобу. Отже, препарати, що використовуються в будь-якому аналізі, повинні оцінюватися у неалергічних осіб [35]. Визначення підвищеної регуляції CD69 є мірою імунного впливу, що має перевагу перед проведенням ТТЛ, тому що цей тест значно швидший і не потребує застосування радіонуклідів як маркерів.

Виконання методики тесту активації Т-лімфоцитів за маркером підвищеної регуляції рецепторів CD69 (рис. 7) полягає в наступному. Лімфоцити виділяють за допомогою фікол-верографінового градієнта та культивують, як описано вище [10]. Препарати використовують у нетоксичних концентраціях, їх розчини готують безпосередньо перед застосуванням. Використовують препарати у таких концентраціях: 100, 200, 500 мкг/мл амоксициліну; 1, 10, 100 мкг/мл ванкоміцину; 1, 10, 100 мкг/мл карбамазепіну; 1, 10, 100 мкг/мл сульфадіпірину; 1, 10, 100 мкг/мл цефуроксиму; 50, 100, 200 мкг/мл сульметоксазолу; 10, 50, 100 мкг/мл фенітоїну; 1, 10, 50 мкг/мл клавуланової кислоти; 1, 10, 100 мкг/мл левофлоксацину тощо [11].

Свіжевиділені Т-лімфоцити (2×10^5) культивують в трьох дублях у 96 луночних планшетах з U-подібним дном для культур тканин у присутності лікарського засобу у зазначених концентраціях, правцевого анатоксину або ІЛ-2 (пролейкіну) – позитивний контроль. Появу маркерів CD69, що з'являються на поверхні CD4+/CD8+ Т-лімфоцитів вимірюють за допомогою проточної цитометрії в присутності людських моноклональних антитіл (PE-CD69, APC-CD3, FITC-CD-8, CD-4 PERCP-I, PE-IgG1) та в ізотипічному контролі. Дані цитометрії виражають у вигляді нормованої середньої інтенсивності флуоресценції. Індекс стимуляції визначають як відношення нормованої середньої інтенсивності флуоресценції культивованих клітин у присутності антигену до нормованої середньої інтенсивності флуоресценції культивованих клітин за відсутності антигену [11].

Для підготовки до внутрішньоклітинного фарбування Т-лімфоцити периферичної крові стимулюють розчинами препаратів чи антигенів протягом 24 годин, паралельно інкубують нестимульовані Т-лімфоцити – негативний контроль. Додають монензин у концентрації 6 мкг/мл в останні 8 годин інкубації перед визначенням. Клітини два рази відмивають льодяним забуференим фосфатом фізіологічним розчином, що містить 0,5 % бичий сироватковий альбумін (БСА) та 0,1 % азид натрію, і фарбують протягом 20 хвилин людськими моноклональними антитілами (PE-CD4 mAb, PERCP-CD3 mAb, FITC-CD69 pAb). Клітини фіксують з додаванням розчину Cytofix/Cytoperm протягом 20 хвилин, ресуспендують у розчині Per/Wosh, що містить препарат, та інкубують протягом 30 хвилин у темному місті. В ролі ізотипів контролю використовують FITC- та алофікоціанін-кон'юговані IgG1 та IgG2a. Після дворазової промивки з Perm/Wash клітини ресуспендують у забуференому фосфатом фізіологічному розчині, що містить 0,5 % БСА та 0,1 % азид натрію, і аналізують, як зазначено вище [11].

Приклад підвищеної регуляції рецепторів CD69 на поверхні CD4+ Т-клітин у пацієнта з алергією на сульфадіпірин показано на рисунку 8. Під час експозиції сульфадіпірину та протиправцевого анатоксину 1,9 % та 1,1 % клітин CD4+ показали підвищену кількість рецепторів CD69, і лише 0,1 % цих клітин мали відповідні рецептори при інкубації у середовищі без додавання ліків. Через 6 і 12 годин антигенної стимуляції підвищеної регуляції рецепторів CD69 на поверхні як CD4+ Т-клітин, так і CD8+ Т-клітин не виявлено. Збільшення інкубаційного періоду (36 чи 72 години) супроводжувалося появою рецепторів CD69, тому інкубація протягом 18 годин є мінімальною для реєстрації підвищеного рівня рецепторів CD69 [11]. Підвищений рівень CD69 не визначався в контролі без додавання препарату. Для практичних цілей можна рекомендувати 48-годинну інкубацію CD4+ Т-клітин з додаванням препарату (рис. 8).

Діагноз гіперчутливості до ліків зазвичай залежить від анамнезу хвороби, результатів шкірних проб і проведених в лабораторних умовах підтверджуючих

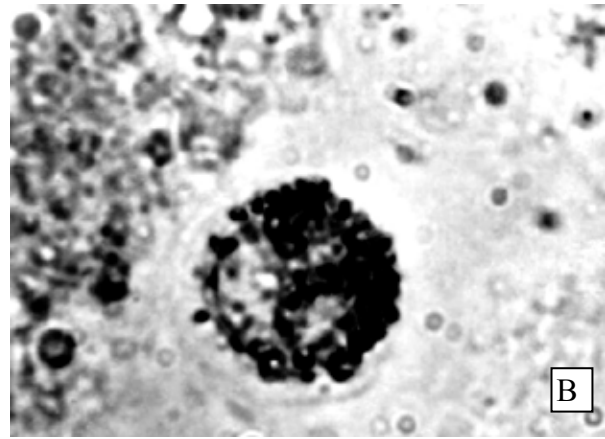
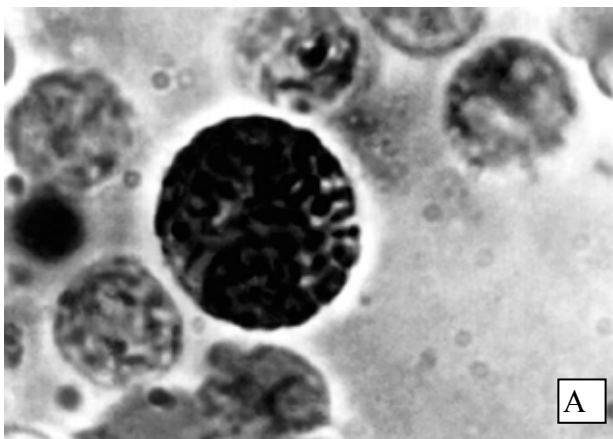


Рис. 1. Прямий тест дегрануляції базофілів: А – мікропрепарат незмінених базофілів, фарбування толуїдиновим синім; В – мікропрепарат базофілів у стані дегрануляції, фарбування толуїдиновим синім. Збільшення $\times 900$

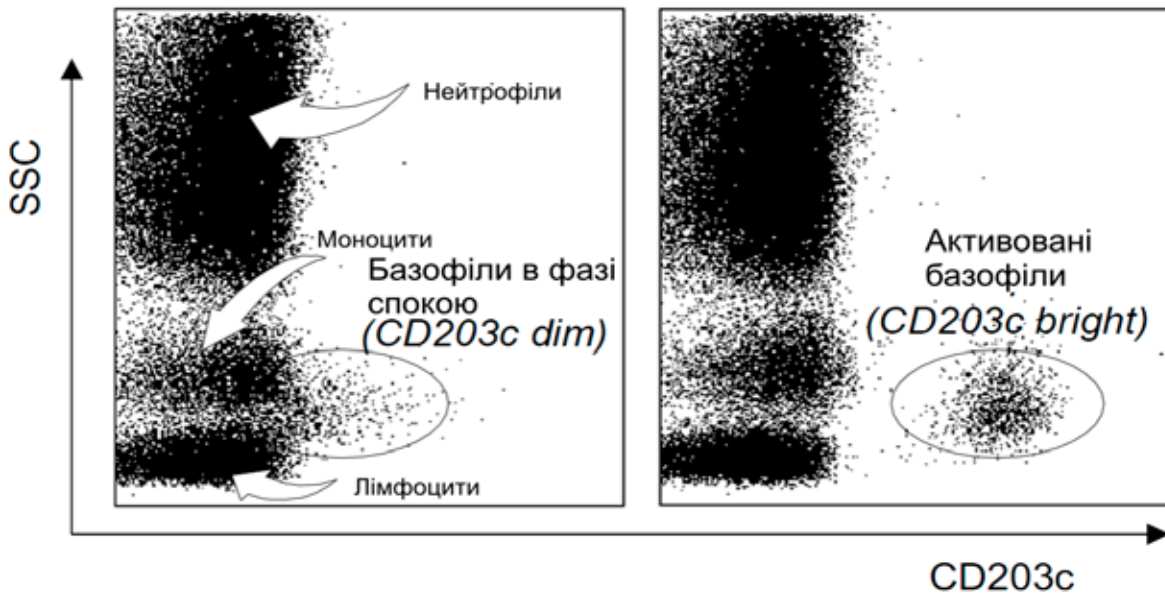


Рис. 2. Результати тесту активації базофілів, виконаного з використанням проточної цитометрії

Представлено CD203c в цільній крові до і після активації базофілів. Невідібрані лейкоцити представлено в лівій частині біпараметричної системи координат, де вісь X – це значення CD203c, вісь Y – значення бічного розсіяння SSC (side scatter characteristics). Ліва гістограма відображає клітини, що покоються, базофіли експресують низькі рівні CD203c (деякі з них не відрізняються від лімфоцитів і моноцитів). Права гістограма відображає клітини після антигенної активації, активовані базофіли визначаються за наявністю високого рівня CD 203c (Buhring H.J. «E-NPP3 (CD203c)», 2002, Leucocyte typing VII, Section New CD antigens, MC10, Oxford University Press, 377–378).

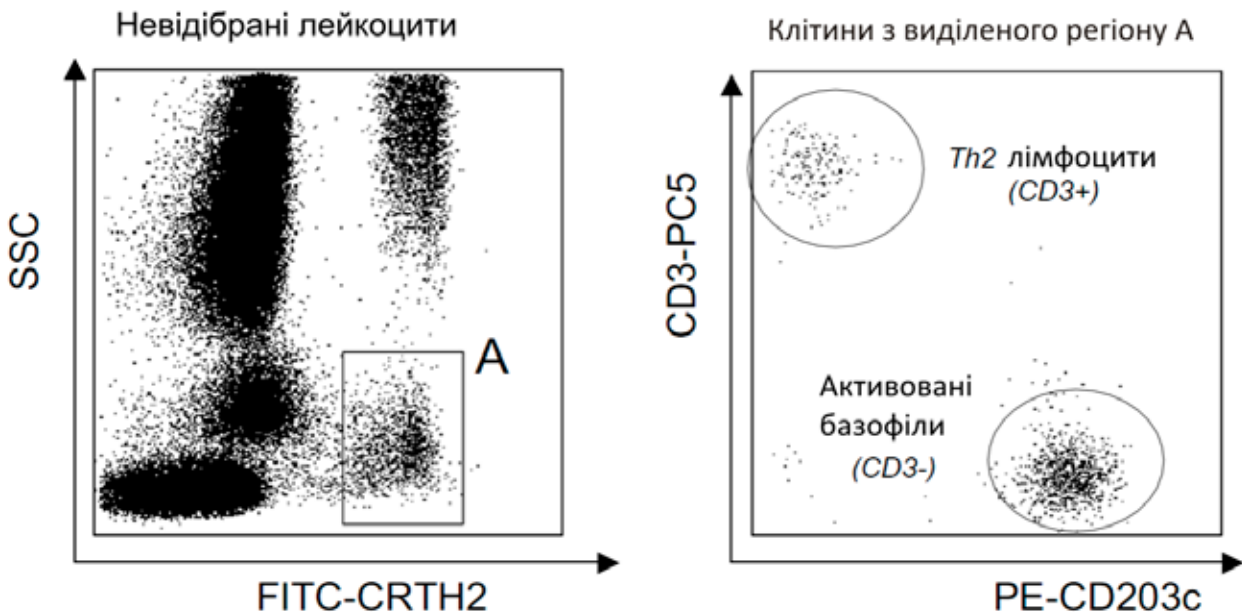


Рис. 3. Ідентифікація клітин, що експресують рецептори CRTh2, за допомогою проточної цитометрії

Гістограма зліва відображає невідібрані лейкоцити у біпараметричній системі координат, де вісь X – це значення клітинного рецептора CRTh2, пов'язаного з FITC, вісь Y – значення бічного розсіяння SSC (side scatter characteristics). Виділяються два типи клітин: одні, з високим розсіюванням світла, характеризують популяцію еозинофілів, інші (у відбраному регіоні А) – містять субпопуляції Th2-лімфоцитів і базофілів. На правій гістограмі представлено клітини з виділеного регіону А, в якому містяться Th2-лімфоцити (містять CD3) і активовані базофіли (що не містять CD3, але мають високий рівень CD203c). Ці популяції клітин відібрано за допомогою моноклональних антитіл PE-CD203c (вісь X) та PC5-CD3 (вісь Y) (Buhring H.J. «E-NPP3 (CD203c)», 2002, Leucocyte typing VII, Section New CD antigens, MC10, Oxford University Press, 377–378).

тестів з препаратами, таких як визначення сироваткових специфічних IgE, що доступні лише для кількох препаратів. Чутливість цих тестів не є 100 %, тому в окремих випадках виникає потреба у проведенні провокаційних тестів. Нові діагностичні засоби, такі як тест активації базофілів, тест антигенної стимуляції клітин і тест трансформації лімфоцитів, розробле-

ні декілька років тому, на сьогодні проходять ретельну перевірку у провідних імунологічних центрах світу. Їх використання може зумовити збільшення результативності діагностичних обстежень, підвищення точності діагностики медикаментозної алергії, тим самим – зменшити необхідність проведення провокаційних тестів.

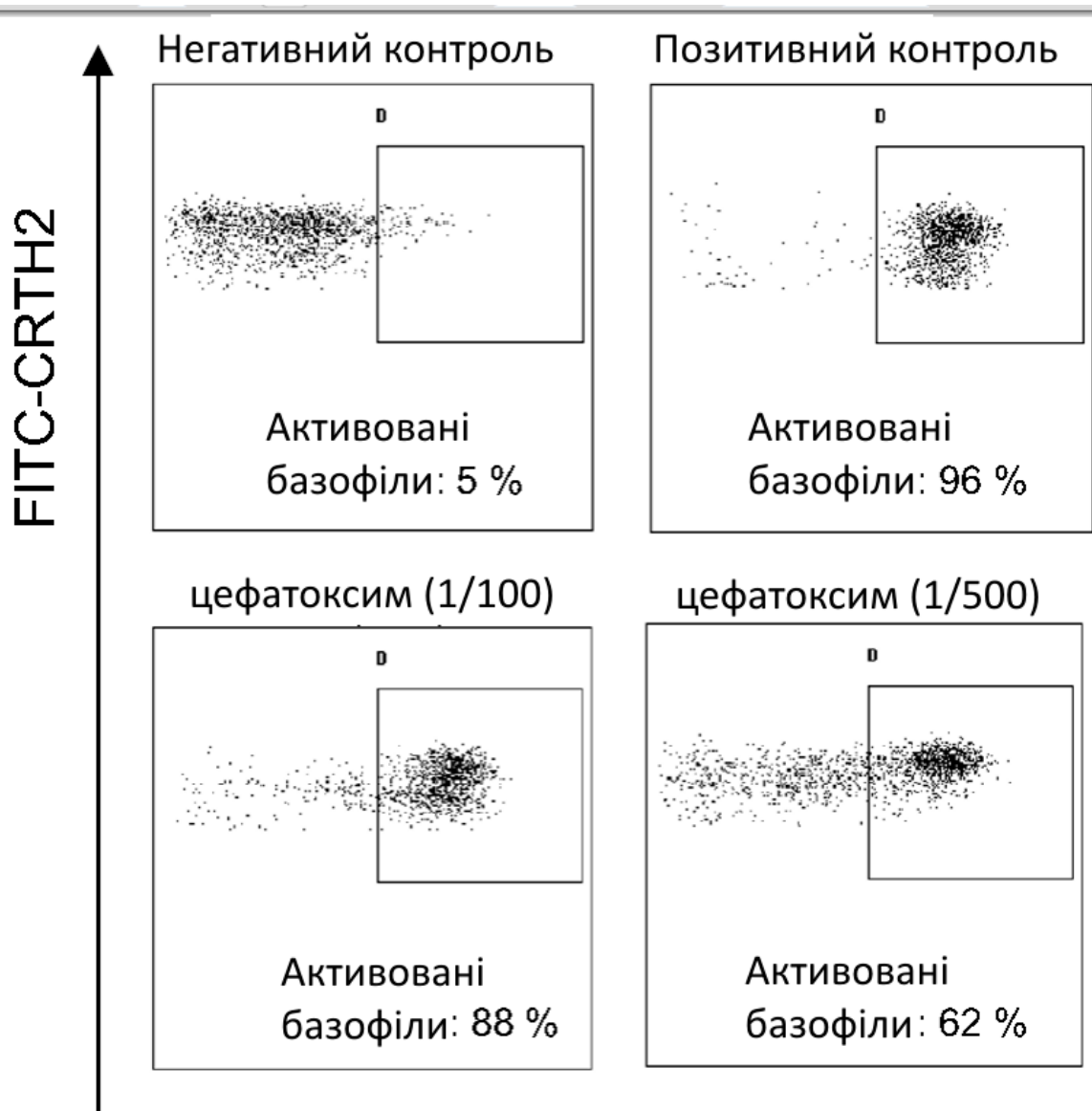
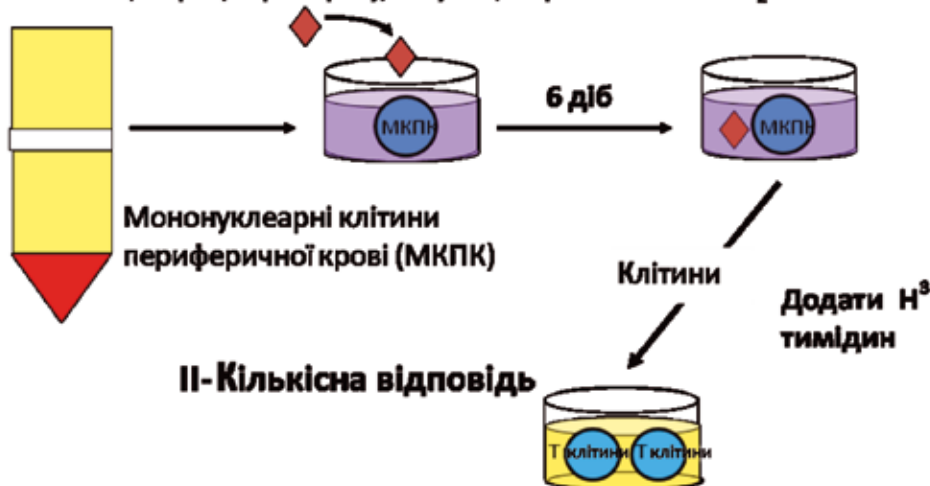


Рис. 4. Підвищена експресія CD203с у базофілах після стимуляції алергеном у хворого з алергією на цефотаксим

Було виділено CRTh2-позитивні базофіли (після виключення Th2-лімфоцитів, як показано на рис. 3). Ці клітини були відібрані за допомогою фарбування CD203с – CRTh2: до стимуляції – негативний контроль, після стимуляції антитілами до IgE – позитивний контроль і після стимуляції алергеном (цефатоксим у розведенні 1/100 та 1/500). Активовані базофіли – відсоток базофілів, що експресують маркер CD203с (Boumiza R., Debard A.-L., Monneret G. The basophil activation test by flow cytometry: recent developments in clinical studies, standardization and emerging perspectives // *Clinical and Molecular Allergy*. – 2005. – №3. – P. 3–9).

I- Активація *in vitro*Різні концентрації препарату, інкубація при 37°C з 5% CO₂

Суспензія клітин та підрахунок радіоактивності, результати: підрахунок клітин та визначення індексу стимуляції (ІС = стимульовані препаратом клітини / нестимульовані клітини)

Рис. 5. Тест трансформації лімфоцитів (пояснення до рисунку – у тексті)

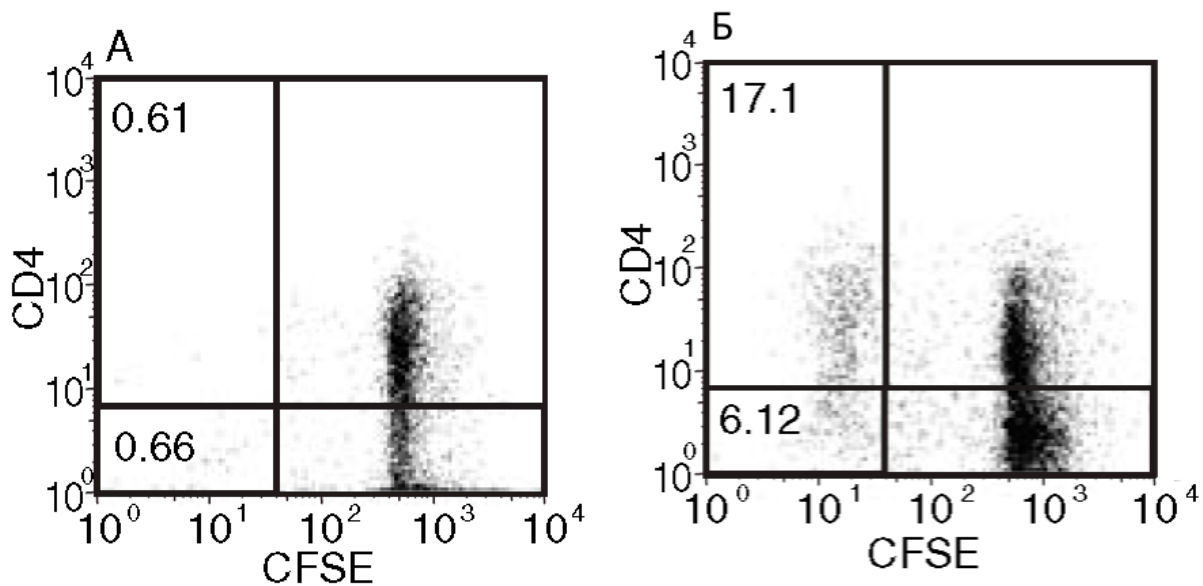
Pichler W.J., Tilch J. The lymphocyte transformation test in the diagnosis of drug hypersensitivity // *Allergy*. – 2004. – Vol. 59. – P. 809–820.

Рис. 6. Результати тесту трансформації лімфоцитів пацієнта, що має медикаментозну алергію до фенітоїну (Tsuge I. та співавт., 2007) Т-клітини периферичної крові хворого, мічені ефіром сукцинімідил-карбоксифлюоресцеїн-діацетату (КФЦД), були культивовані протягом 7 днів у присутності 50 мкг/мл фенітоїну. На 7-й день Т-клітини повторно стимулювали шляхом додавання 50 мкг/мл фенітоїну, потім Т-клітини були стимульовані форболовим ацетатом меристату та іономіцином у присутності брэфелдіну. А – представлено фонові рівні КФЦД CD4+ Т-клітин (лівий верхній квадрант) та CD4+ Т-клітини (лівий нижній квадрант) в культурі без фенітоїну. В – представлено КФЦД CD4+ Т-клітини (лівий верхній квадрант) та CD4+ Т-клітини (лівий нижній квадрант) в культурі у присутності фенітоїну (Tsuge I., Okumura A., Kondo Y. et al. Allergen-specific T-cell response in patients with phenytoin hypersensitivity; simultaneous analysis of proliferation and cytokine production by carboxyfl uorescein succinimidyl ester (CFSE) dilution assay // *Allergol. Int.* – 2007. – Vol. 56(2). – P. 149–155).

Утворення CD69 Т-клітин

I- Активація *in vitro*

Різні концентрації препарату, інкубація при 37°C с 5 % CO₂



Мононуклеарні клітини периферичної крові (МКПК)

48 годин
Підрахунок Т-клітин при проточній цитометрії

II- Кількісна відповідь



CD69 регуляція виражена як відсоток CD69 позитивних Т-клітин

Рис. 7. Тест активації Т-лімфоцитів (пояснення до рисунку містяться у тексті)

Beeler A., Engler O., Gerber B.O., Pichler W.J. Long-lasting reactivity and high frequency of drug-specific T cells after severe systemic drug hypersensitivity reactions // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2006. – Vol. 117. – P. 455–462.

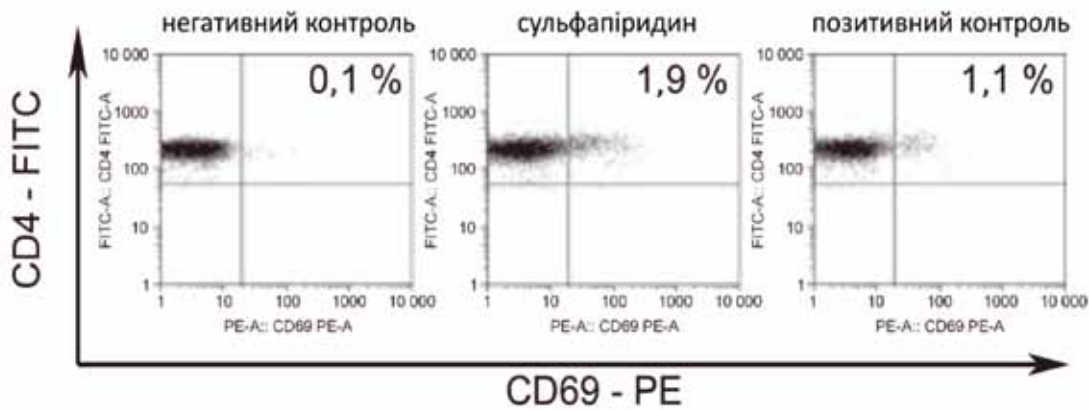


Рис. 8. Проточна цитометрія виявляє підвищену регуляцію рецепторів CD69 на CD4+ Т-клітинах

Експресія рецепторів CD69 на поверхні CD4+ Т-клітин через 48 годин інкубації в культурі без додавання препарату чи правцевого анатоксину (негативний контроль), з додаванням сульфапіридину (препарат) чи протиправцевого анатоксину (позитивний контроль) (Beeler A., Zaccaria L., Kawabata T. et al. CD69 upregulation on T cells as an *in vitro* marker for delayed-type drug hypersensitivity // *Allergy.* – 2008. – Vol. 63. – P. 181–188).

Література

1. Латышева, Т. В. Тактика иммунокоррекции в интенсивной терапии аллергических и иммунопатологических состояний [Текст] : Автореф. дис... — д-ра мед. наук: 14.00.36 / Латышева Татьяна Васильевна. — М., 1996. — 46 с.
2. Новиков, Д. К. Лекарственная аллергия [Текст] / Д. К. Новиков, Ю. В. Сергеев, П. Д. Новиков. — М.: Нац. академия микологии, 2001. — 330 с.
3. Пухлик, Б. М. Лекарственная аллергия и побочные эффекты лекарственных средств в аллергологии [Текст] / Б. М. Пухлик, А. П. Викторов, С. В. Зайков. — Львів: Медицина світу, 2008. — 107 с.
4. Самойлова, Л. Н. К вопросу о диагностике лекарственной аллергии [Текст] / Л. Н. Самойлова, Т. В. Табакова // Тер. арх. — 1992. — № 10. — С. 17–24.
5. Хаитов, Р. М. Клиническая аллергология: Руководство для практических врачей [Текст] / Р. М. Хаитов. — М.: Медпресс-информ, 2002. — 623 с.
6. Adkinson, N. F. Jr. Risk factors for drug allergy [Text] / N. F. Jr. Adkinson // J. Allergy Clin. Immunol. — 1984. — Vol. 74. — P. 567–572.
7. Anderson, J. A. Allergic reactions to drugs and biologic agents [Text] / J. A. Anderson // JAMA. — 2008. — Vol. 368. — P. 2845–2857.
8. Atanaskov, M. Type-I hypersensitivity to ceftriaxone and cross-reactivity with cefalexin and ampicillin [Text] / M. Atanaskov, M. Markov // Allergy. — 2003. — Vol. 58. — P. 537.
9. Baldo, B. Immunoglobulin E binding determinants on β -lactam drugs. Current opinion [Text] / B. Baldo, N. Pham // Allergy and Clin. Immunol. — 2002. — Vol. 2. — P. 297–300.
10. Beeler, A. Long-lasting reactivity and high frequency of drug-specific T cells after severe systemic drug hypersensitivity reactions [Text] / A. Beeler [et al.] // J. Allergy Clin. Immunol. — 2006. — Vol. 117. — P. 455–462.
11. Beeler, A. CD69 upregulation on T cells as an in vitro marker for delayed-type drug hypersensitivity [Text] / A. Beeler [et al.] // Allergy. — 2008. — Vol. 63 (2). — P. 181–188.
12. Bernard, A. Joint report of the first international workshop on human leucocyte differentiation antigens by the investigators of the participating laboratories [Text] / A. Bernard [et al.] // Leucocyte Typing I. — Springer Verlag, 1984. — P. 9–135.
13. Bernstein, I. L. Allergy Diagnostic Testing: An Updated Practice Parameter [Text] / I. L. Bernstein [et al.] // Annals of allergy, Asthma & Immunology. — 2008. — P. 1–148.
14. Boumiza, R. Marked improvement of the basophil activation test by detecting CD203c instead of CD63 [Text] / R. Boumiza [et al.] // Clinical & Experimental Allergy. — 2003. — Vol. 33, №2. — P. 259–265.
15. Boumiza, R. The basophil activation test by flow cytometry: recent developments in clinical studies, standardization and emerging perspectives [Text] / R. Boumiza, A.-L. Debard, G. Monneret // Clinical. and Molecular. Allergy. — 2005. — Vol. 3. — P. 3–9.
16. Bühring, H. E-NPP3 (CD203c) [Text] / H. Bühring // Leucocyte typing VII, Section New CD antigens, MC10. — Oxford University Press. — 2002. — P. 377–378.
17. De Weck, A. L. Cellular allergen stimulation test (CAST) — A new dimension in allergy diagnostics / A. L. De Weck [et al.] // Allergy Clin. Immunol. News. — 1993. — Vol. 5. — P. 9–14.
18. De Weck, A. L. Flow cytometric cellular allergen stimulation test. Technical and clinical evaluation of a new diagnostic test in allergy and pseudo allergy [Text] / A. L. De Weck, M. L. Sanz // ACI International. — 2002. — Vol. 14, №5. — P. 204–215.
19. Ebo, D. G. The in vitro diagnosis of drug allergy: status and perspectives [Text] / D. G. Ebo [et al.] // Allergy. — 2011. — Vol. 66. — P. 127–128.
20. Gamboa, P. M. Flow-cytometric cellular allergen stimulation test to assess basophil activation in allergic patients to β -lactam antibiotics with positive and negative skin test [Text] / P. M. Gamboa, M. L. Sanz // Allergy. — 2000. — Vol. 56, №68. — P. 5.
21. Grushalla, R. Drug metabolism, danger signals and drug-induced hypersensitivity [Text] / R. Grushalla // J. Allergy Clin. Immunol. — 2001. — Vol. 108. — P. 475–488.
22. Hertl, M. Predominance of epidermal CD8+ T lymphocytes in bullous cutaneous reactions caused by β -lactam antibiotics [Text] / M. Hertl [et al.] // J. Invest. Dermatol. — 1993. — Vol. 101. — P. 794–799.
23. Hertl, M. Lymphocyte activation in cutaneous drug reactions / M. Hertl, H. Merk // J. Invest. Dermatol. — 1995. — Vol. 105. — P. 955–985.
24. Hirai, H. Cutting Edge: Agonistic Effect of Indomethacin on a Prostaglandin D2 Receptor, CRTh2 [Text] / H. Hirai [et al.] // J. Immunol. — 2002. — Vol. 168. — P. 981–985.
25. Impicciatore, P. Incidence of adverse drug reactions in paediatric in/out-patients: a systematic review and meta-analysis of prospective studies [Text] / P. Impicciatore // Br. Clin. Pharmacol. — 2001. — Vol. 52. — P. 77–83.
26. Maino, V. Rapid flow cytometric method for measuring lymphocyte subset activation [Text] / V. Maino, M. Suni, J. Ruitenberg // Cytometry. — 1995. — Vol. 20 (2). — P. 127–133.
27. Nagata, K. CR-Th2, an orphan receptor of T-helper-2-cells, is expressed on basophils and eosinophils and responds to mast cell-derived factor(s) [Text] / K. Nagata [et al.] // FEBS Letters. — 1999. — Vol. 459. — P. 195–199.
28. Padovan, E. T-cell recognition of penicillin G: structural features determining antigenic specificity [Text] / E. Padovan // Eur. J. Immunol. — 1996. — Vol. 26. — P. 42–48.
29. Park, B. Advances in molecular toxicology-towards understanding idiosyncratic drug toxicity [Text] / B. Park [et al.] // Toxicology. — 2000. — Vol. 153. — P. 39–60.
30. Pawanka, R. WAO White Book on Allergy 2011–2012: Executive Summary [Text] / R. Pawankar, G. Canonica [et al.]. — World Allergy Organization: Milwaukee, WI, USA. — 2011. — 24 p.
31. Pichler, W. J. Delayed drug hypersensitivity reactions [Text] / W. Pichler // Ann. Intern. Med. — 2003. — Vol. 139. — P. 683–693.
32. Pichler, W. J. The lymphocyte transformation test in the diagnosis of drug hypersensitivity [Text] / W. Pichler, J. Tilch // Allergy. — 2004. — Vol. 59. — P. 809–820.
33. Pichler, W. J. T cell reactivity to drugs [Text] / W. J. Pichler [et al.] // Abstracts XX Internat. Congress of Allergy and Clin. Immunol. (Sweden). — 2011. — P. 166.
34. Platz, I. Hymenoptera-venom-induced upregulation of the basophil activation marker ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3 in sensitized individuals / I. Platz [et al.] // Int. Arch. Allergy Immunol. — 2002. — Vol. 127 (4). — P. 293.
35. Porebski, G. In vitro diagnosis of T cell-mediated drug allergy / G. Porebski, A. Gschwend-Zawodniak, W. Pichler // Clin. Exp. Allergy. — 2011. — Vol. 41 (4). — P. 461–470.
36. Romano, A. Diagnosis and management of drug hypersensitivity reactions / A. Romano [et al.] // J. Allergy Clin. Immunol. — 2011. — Vol. 127 (3 Suppl). — P. S67–73.
37. Torres, M. J. Differences in the immunological responses in drug- and virus-induced cutaneous reactions in children / M. J. Torres [et al.] // Blood. Cells. Mol. Dis. — 2003. — Vol. 30 (1). — P. 124–131.
38. Tsuge, I. Allergen-specific T-cell response in patients with phenytoin hypersensitivity; simultaneous analysis of proliferation and cytokine production by carboxyfl uorescein succinimidyl ester (CFSE) dilution assay / I. Tsuge [et al.] // Allergol Int. — 2007. — Vol. 56 (2). — P. 149–155.
39. Zanni, M. P. T cell reactions in patients showing adverse immune reactions to drugs / M. P. Zanni, S. von Greyerz, B. Schnyder // Inflamm. Res. — 1996. — Vol. 45 (Suppl. 2). — P. 79.

**ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА
МЕДИКАМЕНТОЗНОЇ АЛЕРГІЇ
Часть 2. Методи определения активации
клеток медикаментозными алергенами**

В. Д. Бабаджан, Л. В. Кузнецова,
П. Г. Кравчун, Н. Г. Рындина

Резюме

Увеличение аллергопатологии среди населения, связанное с резким повышением количества лекарств, назначаемых больным, а также с изменением реактивности организма, что приводит

к росту осложненной терапии, в том числе аллергических реакций на медикаменты. Кожные тесты для диагностики лекарственной аллергии немедленного типа далеко не всегда могут быть использованы, для их проведения существует достаточно много противопоказаний, достоверность этих тестов относительно невысокая из-за того, что причиной возникновения аллергической реакции часто является не сам первичный медикамент, а его метаболиты. Поэтому для диагностики лекарственной аллергии вместе с кожными пробами применяются лабораторные тесты.

Подтверждающие тесты с препаратами, такие как определение специфических сывороточных IgE, доступны только для нескольких препаратов; кроме того, чувствительность этих тестов не является 100 %, поэтому в отдельных случаях возникает необходимость проведения провокационных тестов. Новые диагностические средства, такие как тест активации базофилов, тест антигенной стимуляции клеток, его цитометрический вариант (FLOW-CAST), с высокой достоверностью позволяют определить наличие гиперчувствительности немедленного типа при наличии и отсутствии специфических IgE, по медиаторному типу к медикаментозным и другим аллергенам, а также наличие псевдоаллергического механизма клинических проявлений, осуществить диагностику аспириновой астмы и подобных состояний. В то же время, тест трансформации лимфоцитов позволяет выявить аллергию замедленного типа на лекарства по наличию сенсibilизации Т-лимфоцитов.

Выполнение методики теста активации Т-лимфоцитов по маркеру повышенной регуляции рецепторов CD69 позволяет существенно сократить время реакции и тем самым ускорить получение результатов исследования. Таким образом, использование *in vitro* методик определения активации клеток медикаментозными аллергенами приведет к увеличению результативности диагностических обследований, повышению точности диагностики лекарственной аллергии, тем самым уменьшив необходимость проведения провокационных тестов.

Ключевые слова: *in vitro* диагностика лекарственной аллергии, тест активации базофилов, тест антигенной стимуляции клеток, тест трансформации лимфоцитов, тест определения повышенной регуляции рецепторов CD69.

Научно-практический журнал «Астма и аллергия», 2013, № 4.

В. Д. Бабаджан

Харьковский национальный медицинский университет, профессор
61001, Харьков, просп. Ленина, 4
тел.: +380(57)706-30-17, моб.: + 380(67)573-23-38
e-mail: vladdoc1@mail.ru

LABORATORY DIAGNOSIS OF DRUG ALLERGY Part 2. Methods used for determination of drug allergens triggered cell activation

V. D. Babadzhan., L. V. Kuznetsova,
P. G. Kravchun, N. G. Ryndina

Summary

Increase of allergy in the population, associated with a significant increase in the amount of medication prescribed to patients, as well as the immune reactivity changes, which leads to increased complications of therapy, including allergic reactions to medications. Skin tests to diagnose immediate type allergy drug can not always be used. There are many contraindications to carry them out. The reliability of these tests is relatively low due to the fact that the cause of allergic reaction is often not the initial drug and its metabolites. Therefore, skin tests with laboratory tests are usually used for diagnostic of drug allergy.

Confirmatory tests with drugs, such as the definition of specific serum IgE, only available for certain drugs. The sensitivity of these tests is not 100 %, so in some cases there is a need in provocation tests. New diagnostic agents such as basophil activation test, cellular antigen stimulation test and its flow cytometric version (FLOW-CAST) with high reliability can determine the presence of immediate hypersensitivity, the presence or absence of specific IgE, according to the type of neurotransmitter to medical and other allergens, as well as availability pseudoallergic mechanism of clinical manifestations, diagnosis of aspirin-induced asthma and similar conditions. At the same time, the lymphocyte transformation test reveals the delayed type allergies to medicines sensitization of T-lymphocytes.

Performing the test by determining of CD69 upregulation, as the T-lymphocyte activation marker, significantly reduces the response time and thereby accelerate results of the study. Thus, the use of *in vitro* methods for determination of drug allergens triggered cell activation will increase the effectiveness of diagnostic tests, improve the accuracy of diagnosis of drug allergy, thereby reducing the need in provocation tests.

Key words: *in vitro*-diagnostics drug allergy, basophil activation test, cellular antigen stimulation test, lymphocyte transformation test, CD69 receptors upregulation test.

Theoretical and practical J. «Asthma and Allergy», 2013, 4.

V. D. Babadzhan

Kharkiv National Medical Universit, professor
61001, Kharkiv, ave. Lenin, 4
tel.: +380(57)706-30-17, mob.: + 380(67)573-23-38
e-mail: vladdoc1@mail.ru