

*Debreceni Egyetem Orvos és Egészségtudományi Centrum, Bőr- és Nemikórtani Klinika
(igazgató: Hunyadi János dr., egyetemi tanár)¹ és III. sz. Belgyógyászati Klinika
(igazgató: Zeher Margit dr., egyetemi tanár)²*

A bazofil aktivációs teszt és a hisztamin felszabadulás mérés összehasonlító vizsgálata a krónikus autoimmun urticaria diagnosztikájában

Comparison of the basophil activation test and the histamine release assay in the diagnosis of autoimmune chronic urticaria

SZEGEDI ANDREA DR.¹, IRINYI BEATRIX DR.¹, CSUTH ÁGNES DR.¹,
TENGYEL ÉVA², SIPKA SÁNDOR DR.², HUNYADI JÁNOS DR.¹, ÉS GYIMESI EDIT DR.²

ÖSSZEFOGLALÁS

Az autoimmun krónikus urticaria (ACU) klinikai diagnó-
zisa jelenleg az autológ szérumbőrteszt elvégzésén alap-
szik, melyet hisztamin felszabadulás méréssel szükséges
megerősíteni. A szerzők egy módosított bazofil aktivációs
teszt specificitását vizsgálták a hisztamin felszabadulás
mérés párhuzamos elvégzésével. 72 krónikus idiopátiás
urticariában (CIU) szenvedő betegnél, a szérumokkal tör-
ténő inkubáció után mérték szenzitizált atopiás donor ill.
nem atopiás, alig szenzitizált donor bazofil sejtjein a
CD63 aktivációs marker expresszióját áramlási citomé-
terrel. Ugyanezen stimulált sejtek felülszójából a felsza-
badult hisztamin mennyiségét ELISA módszerrel határozták
meg. A hisztamin felszabadulás eredményei mindkét
donor sejtjein nagyon jó korrelációt mutattak a CD63
expresszió eredményeivel. Eredményeik bizonyítják a ba-
zofil CD63 expresszió mérésen alapuló módszer alkal-
masságát a CIU betegek autoimmun patomechanizmusú
csoportjának diagnosztizálására.

SUMMARY

Currently the clinical diagnosis of the autoimmune
chronic urticaria (ACU) is based on the autologous serum
skin test (ASST), which is confirmed by the histamine
release assay (HR). In their present study the authors
compared the specificity of a new, modified basophil
activation test to the HR test. Leukocytes from one highly
sensitized atopic donor (D_A) and one poorly sensitized
non-atopic donor (D_{NA}) were incubated with sera
obtained from 72 chronic idiopathic urticaria (CIU)
patients and the expression of the CD63 activation
marker on the surface of basophils were detected by flow
cytometry. The histamine content of the supernatant of the
same cells was measured by ELISA method. There was a
good correlation between the HR and the CD63
expression test on cells from both donors. Their results
suggest that the CD63 expression assay is suitable for the
diagnosis of patients with ACU.

Kulcsszavak:
**krónikus urticaria - bazofil aktivációs teszt -
hisztamin felszabadulás mérés**

Key words:
**chronic urticaria - basophil activation test -
histamine release assay**

Rövidítések jegyzéke:

atopiás donor (D_A)
autoimmun krónikus urticaria (ACU)
autológ szérumbőrteszt (ASST)
bazofil aktivációs teszt (BAT) = CD63 teszt
bazofil hisztamin felszabadulási teszt (BHR)
dermatomyositis (DM)
N-formil-metionil-leucil-fenilalanin (FMLP)
IgE receptor α lánc (FceRI α)
interkvartilis tartomány (IQ)
krónikus urticaria (CU)
krónikus idiopátiás urticaria (CIU)
nem atopiás donor (D_{NA})
szulfidoleukotrién (SLT)
szisztémás lupus erythematosus (SLE)

Bevezetés

A krónikus urticaria (CU) olyan bőrbetegség, melyben a
csalánkiütések hat héten túl naponta vagy majdnem min-
den nap jelentkeznek (1, 2, 3, 4). Az egyes csalánkiütések
ideje a 24 órát nem haladja meg, s az esetek körülbelül
50%-ában angioedema is kialakul (4). A betegség a popu-
láció 0,1-3%-át érinti és jelentős problémát jelent a kivál-
tó tényezők meghatározása szempontjából, mert a gondos
anamnézis és számos vizsgálat ellenére a kiváltó ok sok
esetben felderítetlen marad (5, 6, 7). Amennyiben kizárjuk
a háttérben álló fizikális urticaria, gócfertőzés, gyógyszer

vagy élelmiszer allergia és urticaria vasculitis lehetőségét, krónikus idiopátiás urticariáról (CIU) beszélhetünk.

Az utóbbi időben nyilvánvalóvá vált, hogy a CIU-ban szenvedő betegek egy csoportjában a betegség autoimmun okokra vezethető vissza. Az irodalmi adatok alapján a betegek 27-50%-ának szérumban funkcionálisan aktív, IgG típusú autoantitestek mutathatók ki, melyek a nagy affinitású IgE receptor α láncával (Fc ϵ RI α), vagy az IgE molekulával szemben termelődnek (8, 9). Az antitestek kötődése a hízósejtekhez és a bazofil granulocitákhoz a sejtek degranulációjához vezet, aminek eredményeképpen gyulladásos mediátorok szabadulnak fel a sejtekből, s végül a szövetekben urtica alakul ki.

Az autoimmun krónikus urticariában (ACU) szenvedő betegeket nehéz megkülönböztetni a CIU csoporttól (10). Az autoantitestekkel rendelkező betegek általában súlyosabb urticariában szenvednek, alacsonyabb az IgE szintjük, a perifériás vérben csökkent a bazofil granulociták száma, ezeknek a különbségeknek azonban nincs akkora megkülönböztető értékük, hogy a diagnosztikában is felhasználhatóak legyenek (5).

Az ACU diagnosztikájának felállításában szűrővizsgálatként a klinikai gyakorlatban segítséget jelent az autológ szérumbőrteszt (ASST) alkalmazása (11). Husz és munkatársai kimutatták, hogy tömény vagy feles hígítású szérummal végezve az ASST magas arányban vezet aspecifikus reakcióhoz, így 1/10 hígításban történő végzését javasolják (12). Véleményünk szerint az ASST eredményét specifikus laboratóriumi vizsgálattal szükséges megerősíteni, funkcionális vagy kötődési tesztekkel (1. táblázat). A funkcionális tesztek segítségével detektálhatók a biológiailag releváns szérumban faktorok, azonban nehéz a standardizálásuk és kevés információt szolgáltatnak a kérdéses molekulák szerkezetéről (13). Közülük a bazofil hisztamin felszabadulási teszt (BHR) jelenleg a legáltalánosabban elfogadott („gold standard”) eljárás ACU-ban az autoantitestek kimutatására. A kötődési tesztek közül a Western blot és ELISA módszerek alkalmasak lennének nagyobb mennyiségű szérumban szűrésére, de nem váltották be a korábban hozzájuk fűzött reményeket, nem kaphatók a kereskedelembe és használatuk során álnegatív és álpozitív eredmények is adódhatnak (14, 15).

I. Funkcionális tesztek	II. Kötődési tesztek
1. Autológ szérumbőrteszt	1. Western blot
2. Bazofil hisztamin felszabadulási teszt	2. ELISA
3. Hízósejtekből történő hisztamin felszabadulás mérése	
4. β -hexóaminidáz felszabadulás vizsgálata patkány bazofil leukémia sejtvonalból	
5. Bazofil CD63 felszíni expresszió vizsgálata	

1. táblázat

Az ACU diagnosztikájában alkalmazott laboratóriumi módszerek

A CD63 molekula egy tetraspan szerkezetű molekulacsaládba tartozó glikoprotein, mely nyugvó bazofil granulociták membránjának felszínén nem expresszálódik, aktivációt követően azonban nagy mennyiségben megjelenik a sejtek felszínén (16). Aktivációs markerként alapját képezi a bazofil CD63 sejtfelszíni expressziós vizsgálaton alapuló bazofil aktivációs tesztnek (BAT), melynek módosított változatát alkalmaztuk korábbi cikkünkben az ACU diagnosztikájában (17). A módszer segítségével kimutattuk, hogy az erősen szenzibilizált atópiás donorok bazofil sejtjei IL-3-mal történő kezelés nélkül sikeresen használhatók *in vitro* az ACU áramlási citofluorimetriás vizsgálatában. Pozitív korrelációt mutattunk ki a bazofil CD63 expressziós vizsgálat és az ASST között.

Jelen vizsgálatunkban célunk volt, hogy a módosított bazofil CD63 expressziós vizsgálat diagnosztikai megbízhatóságát összehasonlítsuk a „gold standard”-ként elfogadott másik funkcionális teszttel, a BHR vizsgálattal az ACU diagnosztikájában. A tanulmány során a módosított bazofil CD63 expressziós vizsgálat és a BHR vizsgálat összehasonlító elemzését végeztük el.

Anyag és módszer

Betegek

Vizsgálatunkban a Debreceni Egyetem Bőrgyógyászati Klinikáján kezelt 72 ICU-ban szenvedő beteg vett részt. A betegség átlagosan 8.4 hónapig tartott (3-32 hónap), és a tünetek majdnem minden nap jelentkeztek. A vizsgált betegek közül 16 férfi, 56 nő volt, átlagéletkoruk 40.4 év (13-74 év).

A vizsgálatokból kizártuk azokat a betegeket, akiknél a bőrelváltozás 24 óránál tovább tartott és gyanúsak voltak az urticaria vasculitisre, illetve a gócfertőzésben, a fizikai urticariában és ételallergiában szenvedőket, továbbá azokat, akik olyan gyógyszert szedtek, amely súlyosbította volna a CU-t. A betegeknél legalább 4 nappal a szérumból levételét megelőzően leállítottuk az antihisztamin kezelést, két héttel korábban a kortikoszteroidok vagy immunszuppresszív gyógyszerek alkalmazását. Valamennyi betegnél elvégeztük az ASST-t, a BHR tesztet és a BAT-ot.

Kontrollként egészséges, nem atópiás egyének szolgáltak ($n=20$). Ezen kívül 15 bőrtünetekkel is rendelkező szisztémás lupus erythematosusban (SLE) szenvedő beteg és 11 dermatomyositiszes (DM) beteg szérumát is vizsgáltuk.

Donorok:

Az atópiás donor (D_A) allergiás rhinitisben szenvedett, szérumban szezonális inhalatív allergénnel szemben termelődött specifikus IgE antitestek voltak jelen, szérumban össz-IgE szintje pedig 1468 kU/l volt. A kísérletek ideje alatt és azt megelőzően legalább 72 órával nem szedett antihisztaminokat.

A nem atópiás donor (D_{NA}) szérumban össz-IgE szintje 1 kU/l volt.

A donor sejtek szeparálása és stimulálása

Az atópiás (D_A) és nem atópiás (D_{NA}) donorból származó, etiléndiamin-tetraecetsav (EDTA) által antikoagulált, 24 ml teljes vért 6% MacroDEX-en ülepítettük 45 percig 37 °C-on. A fehérvérsejt frakciót leszívtuk, majd hideg Hepes-EDTA pufferrel kétszer átmostuk. Ezt követően Ca^{2+} és Mg^{2+} iont tartalmazó HEPES pufferben reszuszpendáltuk a sejteinket (10^7 /ml). Ezután 50 μ l sejtet 50 μ l CU szérummal (1:1-es hígításban) vagy pufferrel inkubáltuk 40 percen át 37 °C-on. A reakciót jégfürdővel és 900 μ l jég hideg Ca^{2+} , Mg^{2+} - és BSA-mentes Hepes puffer hozzáadásával állítottuk le. Ezt követően a sejteket 5 percig centrifugáltuk 500g-n 4 °C-on. A sejtuszupernatát monoklonális antitestekkel festettük a CD63 méréshez. A felülúszót összegyűjtöttük, -70 °C-on tároltuk, majd elemeztük a hisztamin tartalmát.

Az atopiás és nem atopiás donor sejteinek reaktivitását a következő ágensekkel történő inkubációval vizsgáltuk, a bazofil CD63 expresszió meghatározásával: anti-humán IgE monoklonális antitest (0.5 µg/ml, Clone: De2, Immunotech, Marseille, Franciaország), FMLP (N-formil-metionil-leucil-fenilalanin) (10^{-6} M, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Németország), pozitív CU szérums (1/2 végkoncentráció), anti-FcεRIα antitest tartalmát immunoblottalással már előzőleg megerősítették (16).

A bazofil CD63 expresszió vizsgálata áramlási citofluoriméterrel – bazofil aktivációs teszt (BAT)

A CU szérumokkal előinkubált sejteket kecske antihumán IgE-FITC-cel és R-phycoerythrin (PE)-konjugált anti-humán CD63 monoklonális antitesttel festettük 60 percen át 4 °C-on. A még jelen lévő vörösvértesteket lizáló reagens hozzáadásával lizáltuk. A sejteket átmostuk, majd az IgE és CD63 kettősen pozitív bazofil sejteket Becton Dickinson FACS Calibur áramlási citométerrel mértük. A méréshez beállítottunk egy FL1 küszöböt a számunkra érdektelen sejtek nagy részének eltávolítására, és „gate”-eltük (kikapuztuk) a fluoreszkáló, anti-IgE FITC-cel festődött sejteket. Az IgE-FITC és CD63 kettős pozitív sejteket az FL1-FL2 hisztogrammon határoztuk meg a megfelelő izotópustkontroll alkalmazásával. Mintánként legalább 500-1000 bazofil mértünk az áramlási citofluoriméterrel.

A stimuláció nélküli alapérték megállapításához egy külön csőbe csak a puffert pipettáztuk be. Pozitívnak akkor tekintettük az eredményt, ha a 20 negatív, egészséges kontroll szérums által indukált CD63+ sejt szám 95 percentilisénél magasabb volt a kapott érték. (A különböző donor „cut off” értéke: D_A : 5.1%; D_{NA} : 2.2%).

A bazofil hisztamin felszabadulás mérése ELISA módszerrel (BHR)

A CU szérumokkal előinkubált sejtek felülszójából ELISA módszerrel végeztük el a hisztamin tartalom meghatározást a kitben (Immunotech, Marseille, France) szereplő útmutató alapján, duplikátumokban. A totál hisztamin meghatározáshoz 50 µl sejtuszpenzióhoz 950 µl desztillált vizet pipettáztunk azért, hogy lizáljuk őket. A fagyasztás és olvasztás folyamatát kétszer megismételtük, így a sejtek lizálásával kinyertük a sejt teljes hisztamin tartalmát.

Az eljárás menete:

1. Acilezés: műanyag csövekbe 25 µl acilező puffert, 100 µl mintát, standardot vagy kontrollt és 25 µl acilező reagenst mérünk.
2. Immunológiai lépés: az anti-hisztamin tartalmú lemez vályulataiba 50 µl acilezett mintát, standardot vagy kontrollt mérünk és mindegyikhez 200 µl alkalikus foszfáttal jelzett hisztamin konjugátumot adunk. A mikrolemezt 2 órát inkubáltuk 4 °C-on enyhe rázás mellett, majd mosópuferrel háromszor mostuk.
3. Enzimreakció: a reakcióhelyekre 200 µl para-nitrofenil foszfát szubsztát oldatot adunk és a lemezt sötétben, rázás mellett 30 percig inkubáltuk. A reakciót 50 µl 1N NaOH hozzáadásával állítottuk le.
4. Fotometrázás: az abszorbanciát 405 nm-en ELISA reader-en (Lab-systems Multiscan MS, Helsinki, Finnország) olvastuk le.

A vizsgálat kiértékelése:

Értékeléskor a spontán hisztamin felszabadulást levontuk. Az eredményeket a totál hisztamin tartalom százalékaként fejeztük ki. A spontán hisztamin felszabadulás kevesebb volt a totál hisztamin tartalom 5%-ánál. A különböző donorok „cut-off” értékeit a 20 egészséges kontroll szérums által indukált hisztamin felszabadulás 95 percentilisének határoztuk meg (D_A : 11.6% és D_{NA} : 7.3%).

Statistikai analízis:

A normális eloszlású adatok eredményeit átlag $\pm$ SD értékben fejeztük ki, és a két csoport összehasonlítására a Student-féle kétmintás t próbát alkalmaztuk.

A nem-normális eloszlású csoportok adatainak eredményét mediánban, és un. interkvartilis tartományban (IQ) fejeztük ki, megadva a változók 25 és 75 percentilis értékeit. Két nem-normális eloszlású csoport összehasonlításánál Mann-Whitney U tesztet használtunk, míg több csoport összehasonlításánál a „One way ANOVA” eljárást alkalmaztuk, mivel matematikai transzformáció segítségével sem sikerült normális eloszlású adatokat kapnunk. Az adatcsoportok páronkénti összehasonlítását Dunn teszttel végeztük.

Az összefüggéseket Spearman korrelációs koefficiens segítségével fejeztük ki. A $P < 0.05$ -ös értéket tekintettük szignifikánsnak.

Azataink elemzését SIGMAStat, 2.03-as verziójú szoftverrel végeztük.

Eredmények

A donor sejtek jellemzése

Az atopiás donorból (D_A) származó bazofilek membránjának felszínén mindhárom stimulációs ágens hatására nagy mennyiségben expresszáldott a CD63 molekula, s a hisztamin felszabadulás is nagyfokú volt (2. táblázat).

Ugyanakkor a nem atopiás donor (D_{NA}) bazofil granulocitáinak felszínén az anti-humán-IgE hatására kevés CD63 molekula expresszáldott, s a hisztamin felszabadulás is kis mértékű volt. FMLP-vel vagy anti-FcεRIα antitestet tartalmazó CU szérummal stimulálva a sejteket a D_{NA} bazofil sejteken nagyobb mértékű CD63 expressziót és hisztamin felszabadulást lehetett kimutatni, ez azonban kisebb mértékű maradt, mint az atopiás donor sejtei esetében (2. táblázat).

Hisztamin felszabadulás mérése (BHR)

Az atopiás donor bazofil sejteiből a CU szérumok 51.4%-a (37/72) szabadított fel nagy mennyiségű hisztamint, míg a nem atopiás donor sejteiből a szérumoknak csupán 32%-a (23/72) váltotta ki ezt a hatást (3. táblázat). Az atopiás donor sejteit használva a krónikus urticariás betegek szérums szignifikánsan magasabb hisztamin felszabadulást eredményezett ($P < 0.01$), összehasonlítva a nem atopiás donor bazofiljeivel kapott eredményekkel.

Az atopiás és nem atopiás bazofilekből hisztamint nagy mennyiségben felszabadító szérumok 92%-a (34/37) és 96%-a (22/23) adott pozitív eredményt az autológ szérums börtesztben is. Az ASST + csoportban a CU szérumok 85%-a (34/40) indukált hisztamin felszabadulást az atopiás, és 55%-a (22/40) a nem atopiás donor sejteiben.

	CD63 (%)	[átlag $\pm$ SD]	P érték	HR (%)	[átlag $\pm$ SD]	P érték
	D_A	D_{NA}		D_A	D_{NA}	
aIgE	40.26 $\pm$ 5.71	3.30 $\pm$ 0.83	<0.001 s.	42.52 $\pm$ 3.19	5.80 $\pm$ 1.43	<0.001 s.
FMLP	42.90 $\pm$ 4.35	35.64 $\pm$ 5.90	0.057 n.s.	52.95 $\pm$ 4.09	47.18 $\pm$ 6.82	0.143 n.s.
IB+CU se	67.86 $\pm$ 7.09	20.04 $\pm$ 4.35	<0.001 s.	87.44 $\pm$ 6.57	61.64 $\pm$ 5.33	0.169 n.s.
IB+CU se - immunoblottalással bizonyított anti-FcεRIα antitest pozitív CU szérums						

2. táblázat

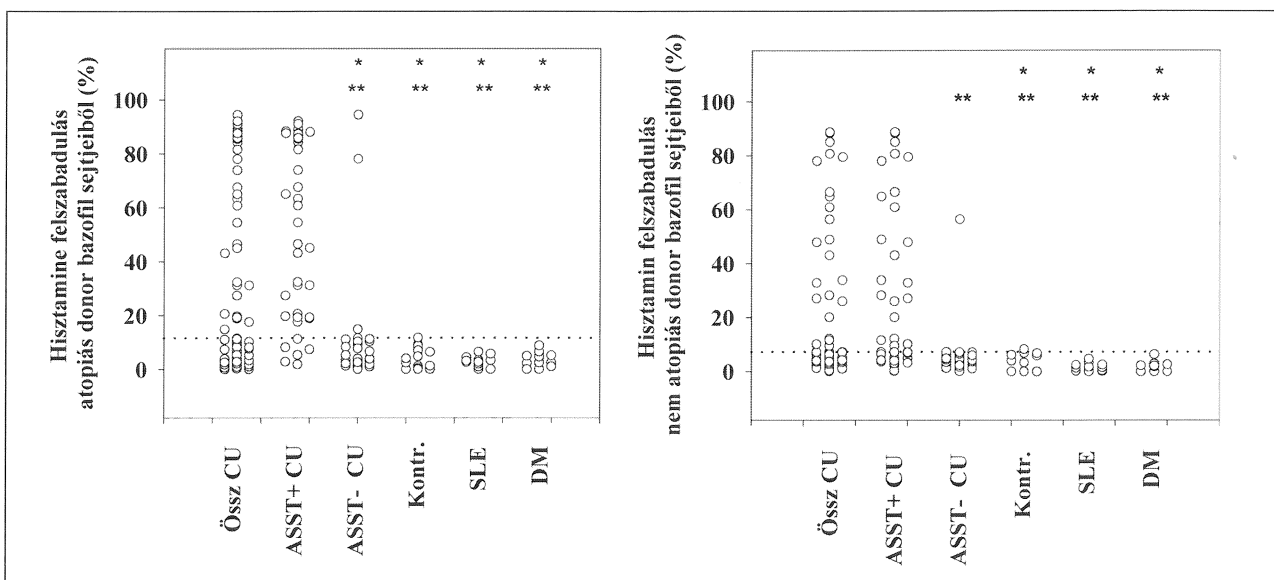
Különböző stimuláló szerek által kiváltott CD63 expresszió és hisztamin felszabadulás (HR) az atopiás és a nem atopiás donor bazofil sejteiben

	D _A				D _{NA}				D _A vs. D _{NA}
	HR n	HR (%) median; (IQ)	HR+ n	HR- n	HR n	HR (%) median; (IQ)	HR+ n	HR- n	HR P érték
Összes CU	72	14.83 (3.54-66.90)	37	35	72	5.76 (3.15-18.11)	23	49	0.01 s.
ASST+CU	40	57.59 (19.48-86.11)	34	6	40	10.89 (4.93-48.43)	22	18	<0.001 s.
ASST-CU	32	3.49 (1.30-9.64)	3	29	32	3.75 (2.23-5.44)	1	31	0.74 n.s.
CD63+CU	41	63.29 (20.34-86.63)	36	5	20	47.94 (26.83-78.41)	19	1	0.32 n.s.
CD63-CU	31	3.14 (1.27-7.16)	1	30	52	4.01 (2.33-6.38)	4	48	0.44 n.s.

IQ – Interkvartilis tartomány (25%-75%); s. – szignifikáns; n.s. – nem szignifikáns

3. táblázat

A DA és DNA bazofil sejteinek hisztamin felszabadítása a CU szérummal való inkubációt követően



1. ábra

Hisztamin felszabadulás az atopiás és nem atopiás donor bazofil sejteiből a CU, kontroll, SLE és DM betegek szérumainak hatására

Az ASST+ CU szérumok mindkét donor esetében szignifikánsan magasabb hisztamin felszabadulást váltottak ki ($P<0.05$), összehasonlítva az ASST- CU betegek szérumaival (1. ábra). Az SLE-s és DM-es betegek széruma nem szabadított fel hisztamint sem az atopiás, sem a nem atopiás donorból.

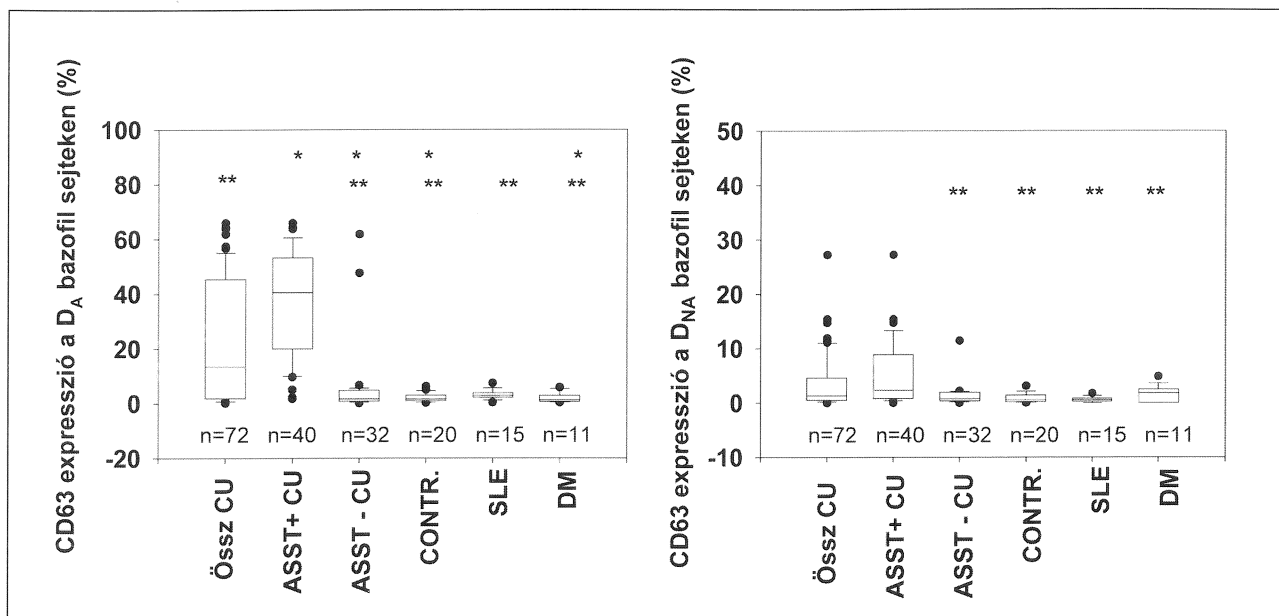
Bazofil CD63 expresszió vizsgálata (BAT)

Az atopiás donor bazofiljainak felszínén a CU szérumok 57%-a (41/72) indukálta a bazofil aktivációs marker (CD63) expresszióját, míg a nem atopiás donor sejteiben a szérumok 28%-a (20/72) váltott ki CD63 expressziót (3. táblázat). Az atopiás donor bazofil sejteiben jóval nagyobb mértékű CD63 felszíni expressziót tudtunk kimutatni a CU betegek szérumával történő inkubáció után, mint a nem atopiás donor bazofiljein ($P<0.001$) (2. ábra).

A szérumokat két csoportba osztottuk a hisztamin felszabadulási vizsgálatban (HR) megfigyelt reaktivitásuk alapján (HR+, HR-). A HR+ szérumok 97%-a (36/37) eredményezett CD63 indukciót az atopiás donor bazofil

sejteiben, míg ugyanezen szérumok 83%-a (19/23) indukált CD63 expressziót a nem atopiás donor sejteiket használva (3. táblázat).

Mindkét donor bazofil sejtjeit HR+ CU szérumokkal indukálva jelentősen nagyobb mértékű ($P<0.05$) CD63 expressziót tapasztaltunk a sejtek membránjának felszínén, mint a HR- CU szérumokkal történő inkubációt követően. A szérumok azon csoportjának, mely pozitív eredményeket adott az ASST vizsgálat során, 92.5%-a (37/40) szintén pozitív lett a CD63 vizsgálatban az atopiás donor bazofiljein tesztelve a szérumokat. Az ASST+ szérumok 50%-a (20/40) adott pozitív CD63 teszt eredményeket abban az esetben, amikor a szérumokat a nem atopiás donor sejteivel stimuláltuk. Mindkét donor bazofiljeinek felszínén az ASST+ CU szérumokkal történő stimuláció jóval nagyobb mértékű bazofil aktivációs marker (CD63) expressziót eredményezett ($P<0.05$), összehasonlítva az ASST- CU szérumokkal végzett stimuláció eredményeivel (2. ábra). SLE-ben és DM-ben szenvedő betegek széruma nem indukált CD63 expressziót a donor sejteken.



2. ábra

A CD63 expresszió az atopiás (DA) és nem atopiás (DNA) donor bazofil sejtjein

Összefüggés az ASST, a BAT és a BHR között

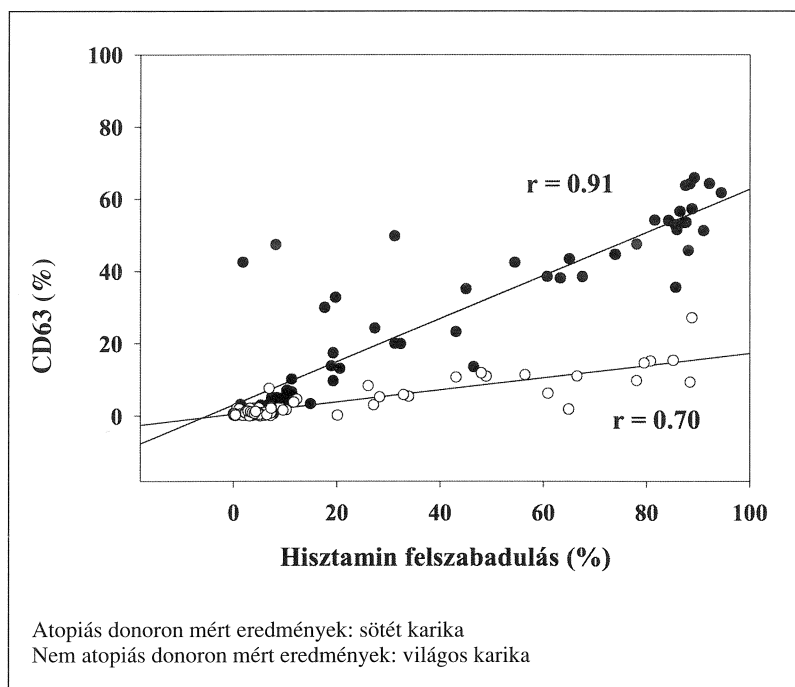
A BHR vizsgálat és a BAT eredményei között szignifikáns korrelációt tapasztaltunk (D_A : $r=0.91$, D_{NA} : $r=0.70$, $P<0.001$ mindkettő esetén) az egyes betegek esetén kapott értékek vizsgálata során (3. ábra). A BHR és az ASST eredményeit összehasonlítva csak abban az esetben tapasztaltunk korrelációt, amikor az atopiás donor sejtjein végeztük a vizsgálatot.

Megbeszélés

Az ACU laboratóriumi diagnózisa nehéz, de nem csupán a rendelkezésre álló laboratóriumi módszerek hiányosságai miatt, hanem azért is mivel az ACU betegcsoport heterogén. Sabroe és mtsai. 5 csoportot különítettek el a szérumok reaktivitása és a kimutatható antitestek alapján (18). Jelenleg a BHR standard módszernek számít a betegség diagnosztizálásakor az autoantitestekkel rendelkező betegek azonosításában. Ebben a tanulmányban kimutattuk, hogy egy funkcionális teszt, a bazofil CD63 felszíni expressziós vizsgálat szignifikáns korrelációt mutat a BHR méréssel. A két vizsgálati módszer között pozitív korrelációt találtunk mind az atopiás, mind a nem atopiás donor bazofil sejtjeit használva.

Elsőként Wedi és munkatársai alkalmazták a bazofil CD63 felszíni expressziós tesztet 40 beteg esetén az ACU diagnosztikájában (19). A kapott eredményeket összehasonlították a BHR vizsgálat, és a szulfidoleukotrién (SLT) termelés eredményeivel. A kísérlet során nem tapasztaltak pozitív korrelációt a BHR, CD63 expresszió és az SLT termelés között. Végül arra a megállapításra jutottak, hogy a CD63 felszíni expresszió és SLT termelés vizsgálata nem használható diagnosztikai markerként az ACU diagnosztikájában.

Ezzel szemben munkacsoportunk elsőként alkalmazta sikeresen a CD63 expressziós vizsgálat egy módosított formáját az ACU diagnosztikájában. Korábbi közle-



3. ábra

Összefüggés a bazofil aktivációs teszt és a hisztamin felszabadulás mérés között

ményünkben beszámoltunk arról, hogy a módosított CD63 expressziós vizsgálat, erősen szenzitizált atopiás donor bazofil sejtek alkalmazásával előzetes IL-3 stimuláció nélkül jó korrelációt mutatott az ASST-tel (17). Jelenlegi eredményeink pedig a „gold standardnak” számító BHR teszt és a CD63 expressziós vizsgálat eredményeinek szignifikáns korrelációját bizonyítják. A mi eredményeink illetve *Wedi és kutatócsoportja* által kapott eredmények közötti különbség a laboratóriumi eljárások közti különbségekből származhat. *Wedi és munkatársai* a kísérletekben teljes vért használtak, a bazofil granulocitákat pedig IL-3-mal stimulálták. Mi a teljes vér helyett leukocitákat teszteltünk, melynek következtében feltehetőleg elkerültük egyéb szérumszerek hatásait, az IL-3-at pedig nem használtuk a kísérleteink során.

Rendszerünk nagyobb mértékű specificitását az is alátámasztotta, hogy kísérleteinkben a DM-ben és SLE-ben szenvedő betegek, továbbá az egészséges kontrollok széruma nem indukált CD63 expressziót a bazofil sejtek felszínén, míg *Wedi és munkatársai* nagyobb mértékű CD63 expressziót mutattak ki a bazofil sejtek és a kontroll szérumszerek inkubációját követően.

Egy közelmúltban megjelent közleményben *De Swert* szintén jó korrelációt talált az ASST és a CD63 expressziós vizsgálat között CU-s betegekben, annak ellenére, hogy nem az általunk alkalmazott módosított módszert használta (20). Kimutatta, hogy a szérumszerek IgG frakciója felelős a CD63 expresszióban megnyilvánuló aktivációért és javasolta az ASST és a CD63 expressziós teszt együttes alkalmazását az ACU diagnosztikájában.

A CD63 expresszió alapuló bazofil aktivációs teszt nem csupán az ACU diagnosztikájában használható eredményesen. Azonnali típusú hiperszenzitivitási reakciók vizsgálatában is kezd elterjedni az alkalmazása, többek között méh és darázscsípés, gyógyszer, latex, pollen és élelmiszer allergiákban (21, 22, 23). Ezen vizsgálati rendszerekben azonban fontos tudni, hogy nem alkalmaznak donor sejteket, hanem a betegtől származó bazofil sejteket kell összehozni egy rendszeren belül az adott allergénnel és mérni a sejtfelszíni CD63 expressziót. Basotest néven forgalomban is kaphatók ezen tesztek. Egy ilyen rendszerben, ahol fűpollenre allergiás betegeket vizsgáltak, *Sainte-Laudy és munkatársai* jó korrelációt találtak a BHR és a CD63 expressziós vizsgálat között (24).

A különböző tanulmányokban a CU szérumszerek 27-52%-ban bizonyultak pozitívnak a hisztamin felszabadulási vizsgálatokban, a kiválasztott beteg populáció és a donor bazofilok függvényében (18). A mi kísérleti munkánkban az atopiás donor (D_A) bazofiljaiból a CU szérumszerek 51%-a váltott ki nagy mennyiségű hisztamin felszabadulást, míg a nem atopiás donor (D_{NA}) bazofiljait a szérumszerek 32%-a aktiválta. Az atopiás és a nem atopiás donor bazofil sejteinek reaktiválásában megfigyelhető különbséget *Wedi és munkacsoportja* szintén megfigyelte (19). A nem atopiás donor IgE-vel gyengén szenzitizált sejteji a szérumszerek IgE-vel kompetitív és nem-kompetitív anti-Fc ϵ RI α antitestjeivel reagálnak, míg az atopiás donor (D_A) IgE-vel erősen szenzitizált sejteji mind az anti-IgE, mind a

nem kompetitív anti-Fc ϵ RI antitestekkel kapcsolatba lépnek. Ezt alapul véve az általunk alkalmazott két donoron kapott BHR eredmények közötti különbségek két dologgal magyarázhatók. Az egyik lehetséges magyarázat az lenne, hogy CU betegek széruma nagy mennyiségű anti-IgE antitestet tartalmaz. Ez azonban nem valószínű, mert különböző tanulmányok azt írták le, hogy a CU betegeknek csupán 9%-a rendelkezik funkcionális anti-IgE antitestekkel, és a legtöbb autoantitest a nagy affinitású IgE receptorhoz kötődik (18). A másik, sokkal valószínűbb magyarázat, hogy az atopiás donor bazofil sejteji erősen aktivált állapotban vannak, ezért a sejtek fokozottabb mértékben szabadítanak fel hisztamint és egyéb mediátorokat (25).

A jelen tanulmányunkban az ASST csak akkor mutatott jó korrelációt a BHR vizsgálatával, ha szenzitizált, atopiás donor bazofil sejteket használtunk. A BHR teszt és az ASST közötti korrelációt vizsgáló tanulmányok eredményei ellentmondásosak. Egyes szerzők egyetértenek abban, hogy az ASST pozitív betegek szérumának csupán egy része képes hisztamin felszabadulást kiváltani, ami az esetleges álpozitív ASST eredményekből ered (3, 4, 18). Egy másik magyarázat az lehet, hogy a funkcionális tesztek szenzitivitása nem megfelelő. Kísérleteink során a BHR mérés és az ASST jól korrelált egymással, ha az *in vitro* teszt szenzitivitását egy erősen szenzitizált atopiás donor alkalmazásával növeltük. *Asero és kollégái* szintén fokozták a BHR vizsgálat érzékenységet egy másik megközelítés segítségével. Hat különböző nem-atopiás donor sejtet (három bazofil granulocitát és három hízósejtet) használva 94%-os pozitívítást kaptak az ASST és a BHR közötti összefüggés vizsgálatakor (26).

Végeredményben az általunk alkalmazott módosított CD63 expressziós vizsgálat megbízható funkcionális tesztnek tűnik az ACU diagnosztikájában, mely jó összefüggést mutat a BHR vizsgálatával. A két funkcionális teszt közötti korreláció erősebb, amennyiben mindkét tesztet erősen szenzibilizált atopiás donor bazofil sejteket használjuk. Az ASST és a két funkcionális módszer összehasonlítása során akkor kaptunk jó egybeesést, ha a funkcionális tesztek atopiás donortól származó sejteken végeztük. Eredményeink alapján a szűrővizsgálatként végzett ASST kiegészítő eljárásaként javasoljuk a bazofil CD63 expressziós vizsgálat alkalmazását az ACU diagnosztikájában, mely alternatívaként szolgálhat a BHR mellett, azon laboratóriumok számára, ahol az áramlási citometria módszere rendelkezésre áll.

IRODALOMJEGYZÉK

1. *Sabroe A., Greaves M. W.*: The pathogenesis of chronic idiopathic urticaria. *Arch. Dermatol.* (1997) *133*, 1003-1008.
2. *Greaves M. W.*: Chronic idiopathic urticaria. *Curr. Opin Allergy Clin. Immunol.* (2003) *3*, 363-8.
3. *Kaplan A. P.*: Chronic urticaria: Pathogenesis and treatment. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2004) *114*, 465-674.
4. *Husz S.*: Az urticaria patogenezise, klinikai formái és kezelése. *Med. Anon.* (2002) *5*, 37-41.
5. *Greaves M. W.*: Chronic urticaria. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2000) *105*, 664-672.

6. Bakos N., Szántó H.: A *Helicobacter pylori* patogenetikai szerepe krónikus urticariában. *Bőrgyógyászati és Venerológiai Szemle.* (1997) 74, 9-13.
7. Hidvégi B., Gonzalez-Cabello R., Temesvári E. és mtsai.: The effect of heat-inactivated *Helicobacter pylori* on the blastogenic response of peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic urticaria. *Int. Arch. Allergy Immunol.* (2001) 126 (2), 167-72.
8. Grattan C. E., Francis D. M., Hide M. és mtsai.: Detection of circulating histamine releasing autoantibodies with functional properties of anti-IgE in chronic urticaria. *Clin. Exp. Allergy.* (1991) 21, 695-704.
9. Hide M., Francis D. M., Grattan C. E. és mtsai.: Autoantibodies against the high-affinity IgE receptor as a cause of histamine release in chronic urticaria. *N. Engl. J. Med.* (1993) 328, 1599-1604.
10. Sabroe R. A., Seed P. T., Francis D. M. és mtsai.: Chronic idiopathic urticaria: Comparison of the clinical features of patients with and without anti-FcεRI or anti-IgE autoantibodies. *J. Am. Acad. Derm.* (1999) 40, 443-50.
11. Sabroe R. A., Grattan C. E. H., Francis D. M. és mtsai.: The autologous serum skin test: a screening test for autoantibodies in chronic idiopathic urticaria. *Br. J. Dermatol.* (1999) 140, 446-452.
12. Husz S., Mihályi L., Dobozy A.: Diagnosztikus problémák autoimmun urticarában. *Bőrgyógyászati és Venerológiai szemle* (2004) 80 (1), 15-18.
13. Fiebiger E., Hammerschmid F., Stingl G. és mtsai.: Anti-FcεRIα autoantibodies in autoimmune-mediated disorders. Identification of a structure-function relationship. *J. Clin. Invest.* (1998) 101, 243-251.
14. Fiebiger E., Maurer D., Holub H. és mtsai.: Serum IgG autoantibodies directed against the α chain of FcεRI: a selective marker and pathogenetic factor for a distinct subset of chronic urticaria patients? *The Journal Clin. Invest.* (1995) 96, 2606-2612.
15. Ferrer M., Kinét J. M., Kaplan A. P.: Comparative studies of functional and binding assays for IgG anti-FcεRIα (α-subunit) in chronic urticaria. *J. Allergy Clin. Immunol.* (1998) 101, 672-676.
16. Knol E.F., Mul F.P., Jansen H. és mtsai.: Monitoring human basophil activation via CD63 monoclonal antibody 435. *J. Allergy Clin. Immunol.* (1991) 88, 328-338.
17. Gyimesi E., Sipka S., Dankó K. és mtsai.: Basophil CD63 expression assay on highly sensitized atopic donor leucocytes – a useful method in chronic autoimmune urticaria. *Br. J. Dermatol.* (2004) 151, 388-396.
18. Sabroe R.A., Fiebiger E., Francis D.M. és mtsai.: Classification of anti-FcεRI and anti-IgE autoantibodies in chronic idiopathic urticaria and correlation with disease severity. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2002) 110, 492-99.
19. Wedi B., Novacovic V., Koerner M. és mtsai.: Chronic urticaria serum induces histamine release, leukotriene production, and basophil CD63 surface expression – Inhibitory effects of anti-inflammatory drugs. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2000) 105, 552-560.
20. De Swerd A., Van Den Keybus C., Kasran A. és mtsai.: Detection of basophil-activating IgG autoantibodies in chronic idiopathic urticaria by induction of CD63. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2005) 116, 662-667.
21. Erdmann S.M., Sachs B., Kwiecien R.: The basophil activation test in wasp venom allergy: sensitivity, specificity and monitoring specific immunotherapy. *Allergy.* (2004) 59, 1102-1109.
22. Sanz M.L., Gamboa P.M., Antépara I. és mtsai.: Flow cytometric basophil activation test by detection of CD63 expression in patients with immediate-type reactions to betalactam antibiotics. *Clin. Exp. All.* (2002) 32, 277-286.
23. Saporta M., Kamei S., Persi L. és mtsai.: Basophil activation during pollen season in patients monosensitized to grasspollens. *Allergy.* (2001) 56, 442-445.
24. Sainte-Laudy J., Sabbah A., Drouet M. és mtsai.: Diagnosis of venom allergy by flow cytometry. Correlation with clinical history, skin test, specific IgE, histamine and leukotriene C4 release. *Clin. Exp. Allergy.* (2000) 30, 1166-1171.
25. Bochner B.S.: Systemic activation of basophils and eosinophils: Markers and consequences. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2000) 106, S292-302.
26. Asero R., Lorini M., Chong S.U. és mtsai.: Assessment of histamine-releasing activity of sera from patients with chronic urticaria showing positive autologous skin test on human basophils and mast cells. *Clin. Exp. Allergy.* (2004) 34, 1111-1114.

Érkezett: 2006. I. 18

Közlésre elfogadva: 2006. II. 9.