
В.В. Янченко

Витебский государственный медицинский университет, г. Витебск, Беларусь

ОДО "Научно-исследовательское предприятие Ресан", г. Витебск, Беларусь

Chronic urticaria and phenotyping of blood basophils by IgE-binding peptide

Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus

JSC "Scientific-research enterprise Resan", Vitebsk, Belarus

Аннотация

ε α

ε α

ε α

ε α

ε α
ε α

ε α

ε α

Иммуноглобулин Е (IgE) это маркерный иммуноглобулин, который информирует клетки организма об опасности проникшего в него антигена/аллергена и необходимости незамедлительной реакции клеток на эту интервенцию. В настоящее время доминирует точка зрения, которая приписывает 2 ключевых роли иммуноглобулину Е – первая, защита от паразитов и гельминтов, вторая – участие в аллергии [1, 2]. Ранее мы показали, что повышение концентрации иммуноглобулинов Е класса происходит не только при аллергии, паразитарной и глистной инвазии, но и у больных с хроническим обструктивным бронхитом [3]. Свободный IgE не влияет на клетки человека, его регуляторный эффект начинает проявляться только после связывания в клеточными рецепторами [4]. На современном этапе развития иммунологии и аллергологии наиболее актуальными являются исследования, которые посвящены изучению клеток, несущих иммуноглобулин Е. Для выявления IgE на лейкоцитах и, в частности, на базофилах мы использовали синтетический пептид $p_{136-142}$ FcεRIα, аналог активного центра высокоаффинного рецептора иммуноглобулина Е. Синтетические пептиды, аналоги активного центра высокоаффинного рецептора иммуноглобулина Е можно использовать для выявления аллергенспецифического IgE в сыворотке крови и иммунопрофилактики экспериментальной бронхиальной астмы [5, 6, 7, 8]. Недавно появились исследования по связыванию IgE пептидами имеющими мимекрию с высокоаффинным рецептором иммуноглобулина Е [9,10]. Одним из частых проявлений аллергии являются хронические крапивницы, в патогенезе которых участвуют базофилы и тучные клетки, сенситизированные специфическими иммуноглобулинами Е класса. Общеизвестным маркером базофилов крови, наиболее часто используемым для их фенотипирования и идентификации является CD203c (ectonucleotide pyrophosphatase (E-NPP3)) [11, 12]. CD203c активируется с помощью анти-IgE антитела и аллергенов [13]. Определение базофилов крови, несущих связанный высокоаффинным рецептором иммуноглобулин Е, является необходимым условием оценки фенотипа этих клеток при аллергопатологии.

Цель и задачи исследования

Целью исследования являлась идентификация базофилов крови, несущих IgE с использованием синтетического пептида $p_{136-142}$ FcεRIα, аналога активного центра высокоаффинного рецептора иммуноглобулина Е при хронических крапивницах.

Для фенотипирования базофилов крови использовали комплексные тест-системы для научных исследований «Биоскан-М1», лот SI 203c-45.25 (ОДО «НИКП РЕСАН», Беларусь) содержащие моноклональные антитела, меченные флуорофорами: CD203c PE, CD45 PE-Cy7. Для выявления IgE использовали синтетический гептапептид $p_{136-142}$ FcεRIα, аналог активного центра высокоаффинного рецептора иммуноглобулина Е (патент РБ №11361), меченный ФИТЦ, который изготовили О.В. Грибовская, В.П. Мартинович, В.П. Голубович в лаборатории прикладной биохимии ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси», Минск, Беларусь и любезно предоставили нам для исследований.

Фенотипирование клеток крови проводили с помощью проточного цитометра Cytomics FC 500 (Beckman Coulter Inc., США). Для лизиса эритроцитов использовали лизирующий раствор OptiLyse C, каталожный №A11894 (Beckman Coulter Inc., США).

Характеристика обследованных пациентов

Было обследовано 30 добровольцев, которые были разделены на 2 группы: 15 были здоровы и не имели аллергии в анамнезе, а у 15 было обострение хронической крапивницы (находились на лечении в аллергологическом отделении Витебской областной клинической больницы). Добровольцы первой и второй группы были сопоставимы по полу и возрасту. Диагноз крапивницы был установлен согласно рекомендациям Европейского (2009), Британского (2007) и Российского (2007) согласительных документов по крапивнице и ангиоотеку [14, 15, 16].

Подготовку клеток крови для выполнения исследования проводили следующим образом: утром, натощак, брали 5 мл крови из локтевой вены в пробирку с гепарином (20 ед. на 1 мл крови). Кровь перемешивали и переносили 1,0 мл крови в полиэтиленовую микропробирку «Эппендорф» и доставляли в лабораторию. Затем кровь перемешивали и забирали по 0,1 мл на исследование.

Протокол исследования

К 100 мкл цельной равномерно перемешанной гепаринизированной крови добавляли 2 мкл раствора моноклональных антител тест-системы «Биоскан-М1», лот SI 203с-45.25 и 1 мкл рабочего раствора синтетического гептапептида p₁₃₆₋₁₄₂FcεRIα-FITC. После добавления антител инкубировали клетки 15 минут при комнатной температуре, затем добавляли 500 мкл лизирующего эритроциты раствора OptiLyse C, каталожный №A11894 и инкубировали клетки 10 минут в термостате при 37°C, после чего добавляли к клеткам 500 мкл буферного раствора и оценивали клетки на проточном цитометре Cytomics FC 500.

Задействованные каналы и флуоресцентные метки:

Канал	Флуоресцентная метка
FL1	p ₁₃₆₋₁₄₂ FcεRIα± FITC
FL2	CD203c PE
FL5	CD45 PE-Cy7

В протоколе устанавливали:

1. FS/SS Ungated
2. CD203 PE Ungated (FL2), выделяли зону CD203c позитивных клеток
3. p₁₃₆₋₁₄₂FcεRIα FITC Ungated (FL1), выделяли зону p₁₃₆₋₁₄₂FcεRIα позитивных клеток
4. p₁₃₆₋₁₄₂FcεRIα FITC/CD203c PE (FL1/FL2) из зоны CD203c позитивных клеток

Достоверность различий между показателями двух групп проводили путем статистической обработки с использованием пакета программ MS Excel, Statsoft Statistica 7. Анализировали результаты исследования непараметрической статистикой, использовали U тест Манна-Уитни.

Исследование на проточном цитометре крови 30 добровольцев: здоровых и больных хронической крапивницей проводили через 1,5-4 часа после забора крови.

Методом проточной цитометрии оценивали процент IgE⁺ лейкоцитов от всех лейкоцитов крови, процент CD203c⁺ лейкоцитов от всех лейкоцитов крови и процент CD203c⁺IgE⁺ лейкоцитов от всех лейкоцитов крови здоровых и больных хронической крапивницей. Результаты представлены в таблице 1.

При помощи синтетического пептида p₁₃₆₋₁₄₂FcεRIα, связывающего IgE и меченного ФИТЦ, мы идентифицировали иммуноглобулин E на клетках крови и установлены различия между базофилами пациентов с хронической крапивницей и здоровых добровольцев.

Для характеристики базофилов крови, несущих связанные IgE, мы предложили использовать базофильный индекс сенсибилизации (БИС), отражающий процент базофилов несущих IgE (CD203c⁺IgE⁺), связанный с высокоаффинным рецептором иммуноглобулина E от общего количества базофилов CD203c⁺. У здоровых добровольцев, не страдающих аллергией базофильный индекс сенсибилизации был 37,4 [31,3-48,0], в то время как у пациентов с крапивницей в период обострения БИС был 52,1 [44,4-62,5].

У здоровых добровольцев, не страдающих аллергией, CD203c⁺IgE⁺ базофилы составляли 5,4% от всех IgE⁺ лейкоцитов, у пациентов с крапивницей – 6,2%.

У пациентов страдающих крапивницей в период обострения заболевания имелась тенденция к увеличению процента CD203c⁺IgE⁺ базофилов и IgE⁺ лейкоцитов крови, однако, достоверно изменялся только базофильный индекс сенсибилизации, почти на 60% увеличивалось количество базофилов, несущих связанный

Таблица 1. Относительное количество клеток крови больных с крапивницей и здоровых

Группа	% IgE ⁺ лейкоцитов Me [LQ-UQ]	базофилов от общего количества лейкоцитов Me [LQ-UQ]		БИС Me [LQ-UQ]
		CD203c ⁺ %	CD203c ⁺ IgE ⁺ %	
Здоровые (n = 15)	2,28 [1,65-3,14]	0,28 [0,23-0,31]	0,11 [0,07-0,15]	37,4 [31,3-48,0]p ^{M-W}
Хроническая крапивница (n = 15)	2,73 [1,57-4,22]	0,26 [0,22-0,28]	0,14 [0,11-0,15]	52,1 [44,4-62,5]p ^{M-W}

Примечания: p^{M-W} - достоверность различий между группами (тест Манна-Уитни, p<0,05).

высокоаффинным рецептором иммуноглобулин Е, по сравнению со здоровыми добровольцами. Ранее было показано, что повышение сывороточного уровня IgE приводит к повышению экспрессии высокоаффинного рецептора [17], при обострении хронической крапивницы на базофилах усиливается экспрессия CD203c [18]. Наши результаты полностью согласуются с этими исследованиями. При взаимодействии IgE антител с причинно значимым аллергеном, сенсibilизированные тучные клетки и базофилы немедленно дегранулируют с выбросом медиаторов, которые через несколько минут (12-20) индуцируют клинические проявления болезни. Базофильный индекс сенсibilизации (процент CD203c⁺IgE⁺ от CD203c⁺ базофилов) можно использовать в качестве объективного иммунологического маркера обострения крапивницы. Кроме этого, определение базофильного индекса сенсibilизации в динамике может быть полезным и для профилактики обострений. При увеличении БИС пациентам с крапивницей необходимо строго соблюдать эли-

минационный режим и минимизировать контакт с гистаминолибераторами.

1. Синтетический пептид p₁₃₆₋₁₄₂FcεRIα, связывающий IgE и меченный ФИТЦ идентифицировал иммуноглобулин Е на клетках крови и позволил установить различия между базофилами пациентов с хронической крапивницей и здоровых добровольцев. У здоровых добровольцев процент IgE базофилов был 37,4 [31,3-40,0], у пациентов с обострением хронической крапивницы - 52,1 [44,4-62,5].
2. У пациентов с обострением хронической крапивницы на 60% увеличивается количество базофилов, несущих связанный высокоаффинным рецептором иммуноглобулин Е, по сравнению со здоровыми людьми.
3. Базофильный индекс сенсibilизации (процент CD203c⁺IgE⁺ от CD203c⁺ базофилов) можно использовать в качестве объективного иммунологического маркера обострения крапивницы.

1. Новиков Д.К., Новиков П.Д. Клиническая иммунопатология. М.: Мед. лит.; 2009, 464 с.

2. Stephen J. Galli, Mindy Tsai. IgE and mast cells in allergic disease. Nat Med. 2012 May 4; 18(5): 693-704.

3. Смирнова О.В., Янченко В.В., Новиков Д.К. Иммуноглобулин Е у пациентов с бронхолегочной патологией. Медицинские новости. 2012; 10: 90-94.

4. Гуцин И.С. Аллергическая реактивность – эволюционное приобретение высокоорганизованных животных. Российский аллергологический журнал. 2014; 1: 7-16.

5. Янченко В.В. Выявление специфических IgE антител октапептидом, аналогом Fcε

Сведения об авторах:

Янченко Владимир Вилиянинович, к.м.н., доцент кафедры клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПК УО «ВГМУ», 210023, г.Витебск, пр-т Фрунзе, 27. Тел. 80212575380; E-mail: all-vgmu@mail.ru (контактное лицо)

Величинская Ольга Геннадьевна, аспирант кафедры клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПК УО «ВГМУ», 210023, г.Витебск, пр-т Фрунзе, 27. Тел. 80297153817; E-mail: velichinskaja@rambler.ru

Новиков Дмитрий Кузьмич, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПК УО «ВГМУ», 210023, г.Витебск, пр-т Фрунзе, 27. Тел. 80212575380; E-mail: all-vgmu@mail.ru

Поступила 19.05.2014 г.