

- } ALERGOLOŠKA IN
IMUNOLOŠKA SEKCIJA
SZD
- } ZDRUŽENJE ZA PRETOČNO
CITOMETRIJO

Zbornik sestanka:

Pretočna citometrija v alergologiji in pulmologiji

Ljubljana, Medicinska fakulteta
Univerze v Ljubljani

17. november 2018

Izdajatelj
Alergološka in imunološka sekcij SZD

Urednik zbornika
Mitja Košnik

Strokovni odbor srečanja
Peter Korošec, Mitja Košnik

Organizacija srečanja
Robert Marčun, Mitja Košnik, Peter
Korošec

Izvedbo sestanka so omogočili:

**Glaxo SmithKline
Ewopharma**

Chiesi
IRIS
Lek
Medias International
Novartis

Program

Ura Trajanje

8:00	Registracija <i>Moderatorja: Mitja Košnik, Peter Korošec</i>
8:15	EAACI po EAACI – Renato Eržen, Mojca Bizjak, Matija Rijavec
8:50	BAT osnove, markerji, alergeni in analiza– Peter Korošec
9:30	Uporabnost BAT pri preobčutljivosti za strup kožekrilcev: napoved teže reakcije in zapletov imunoterapije - Julij Šelb in Peter Kopač
10:00	Satelitski simpozij GlaxoSmithkline
10:20	ODMOR
10:40	Uporabnost BAT pri diagnostiki alergije za zdravila - Tina Vesel Tajnšek
11:00	Novi metodološki BAT pristopi: avtomatizirana pretočno citometrična analiza in fluorescenčno označevanje alergenov – Ana Koren
11:20	Mast cell activation test (MAT): a novel approach in the diagnosis of allergic disease and anaphylaxis - Rajia Bahri
12:00	Satelitski simpozij Ewopharma
12:15	ODMOR za kosilo
13:00	Imunofenotipizacija v BAL: metodologija, markerji in analiza– Matija Rijavec
13:30	Klinična uporabnost imunofenotipizacije v BAL – Katarina Osolnik
13:50	Imunofenotipizacija pljučnih tkivnih limfocitov pri bolnikih s terminalnim KOPB – Irena Šarc
14:05	Imunofenotipizacija tkivnih limfocitov pri bolnikih s polipoznim in nepolipoznim kroničnim rinosinuzitisom – Tanja Soklič Košak
14:25	Vpliv imunoloških in psiholoških dejavnikov na oceno teže senenega nahoda – Katarina Barbara Bajec, Maja Cvelbar

Basophil activation test (BAT): osnove, markerji, alergeni in analiza

Prof. dr. Peter Korošec, dipl. univ. biol. Laboratory for Clinical immunology and Molecular Genetic, University Clinic of Pulmonary and Allergic disease Golnik. peter.korosec@klinika-golnik.si

Introduction

Basophils and mast cells are key effector cells in immediate- type allergic reactions. The clinical impact of basophil activation test (BAT) is due to the unique ability of these cells to degranulate upon cross-linking of the specific IgE bound on membrane-bound high-affinity IgE receptor (FcεRI) by allergen exposure. Compared with the determination of IgE in serum, the basophil activation test (BAT) offers a major advantage of being able to demonstrate allergenic activity of IgE as positive test results will only occur after successful cross-linking of the FcεRI and not by monovalent binding as seen in IgE assays. Currently, BAT with CD63 is the best clinically validated test but also the BAT based on CD203c has been shown to be a reliable test. Some commercial BAT protocols are standardized; however different in house protocols are still wildly used and in that case lab has to validate their own method. Flow cytometric quantification of activated basophils can be used either on whole blood or on PBMCs separated by buffy coat centrifugation or sedimentation over dextran. Nevertheless, there is a clear preference for whole-blood assays, which preserve basophils to a greater extent and can be performed more efficiently. Researches in Slovenia pioneering BAT research (with first publication in 2005), and University Clinic Golnik is currently one of the most recognized groups in the global field of BAT with publishing of more than 20 peer-reviewed articles and more than 1000 citations.

Importantly, basophils become sensitized three hours after introduction of IgE by plasma transfusion, and persist in circulation with half-life ranging from four to ten days. Blood IgE has a half-life of two days. The free IgE concentration determines the density of FcεRI-IgE complexes of both basophil and mast cells. Basophils have thus sampled the recent IgE distribution in circulation, where mast cells take 3 months to adapt to a change in free circulating IgE. Thus mast cells and basophils of a given individual will thus present similar, but not necessarily identical, repertoires of IgE.

Selection of allergen preparations

Protein allergens are used in concentrations starting from the ng to µg/ml and are usually diluted for 4 log concentrations before maximal reactivity is achieved. Drug allergens are typically active in the mg/ml range, and can be diluted 2 to 3 fold. It is important to compare data only when the allergen preparation and concentrations are comparable; failing this the test can only give a limited result. Native allergen extracts or recombinant allergen can be used; however due to inherent measurements of allergenic activity of IgE the extract are preferable and recombinant allergens are rarely used.

Staining strategy and activation markers

In resting or activated basophils, cell surface expression of the CCR3 and CD123/HLA-DR are the most consistent. IgE gating strategy is showing a high variation and up to 80% of non-basophils in the selected gate in certain donors.

CD63 is a membrane protein localized to the same secretory lysosomal granule that contains histamine. Following the discovery of the quantal upregulation of CD63 during basophil activation the BAT was developed in early 2000s. Translocation of CD63 to the cell membrane during degranulation can be measured by flow cytometry and CD63 is activation marker of anaphylactic degranulation. Another activation marker is CD203c, which correlated with picomolar degranulation.

Expression of results

BAT full dose response curves is bell shaped dependent to a different degree on the used markers, priming conditions and individual donor differences. If stimulations with a single allergen dose is compared it is therefore important to ensure that the allergen dose used does not exceed the optimal allergen dose for any of the individuals. Usually the maximum percentage of activated basophils is determined. In order to evaluate the appropriate cutoff points, receiver-operating characteristic (ROC) curves are used to find the best balance between sensitivity and specificity. The clinical and diagnostic relevance of addressing basophil maximal reactivity is depend on different allergens and protocols.

Basophil sensitivity EC50 can be calculated using four parameter logistic regression if the maximal activating concentration has been determined and basophil activation data is available at least 4 log or half-log (factor 0.3) dilutions of the maximal activating concentration. The clinical term CD-sens, 100 x the inverse of basophil sensitivity can be calculated if the maximal activating allergen concentration is found. CD-sens is determined by linear regression through the maximal activating allergen concentration and basophil activation data covering from 2 dilutions of the maximal activating allergen concentration (Figure 1). A combined evaluation of sensitivity and reactivity is used by calculating AUC (Area Under Curve) by the trapezoid method using the formula $\log(\text{concentration}) \times \text{percentages of activated basophils}$ (or $\log(\text{dilution}) \times \text{percentages of activated basophils}$) (Figure 2). This method also takes the decreased reactivity with high allergen doses into account in addition to sensitivity and reactivity.

Recently a novel approach of normalization of BAT allergen response emerges for better comparison between individuals and follow-up, and for global validation of diagnostic and prognostic BAT cut-offs. By this approach we are now calculating the ratio between allergen CD63 and anti-FcεRI mAb response and this variable is named CD63 ratio. Importantly, BAT sensitivity, AUC and CD63 ratio are currently increasingly used for addressing changes induced by allergen treatment and for clinically relevant diagnosis.

Major Resource

Position paper: Hoffmann HJ, Santos AF, Mayorga C, Nopp A, Eberlein B, Ferrer M, Rouzair P, Ebo DG, Sabato V, Sanz ML, Pecaric-Petkovic T, Patil SU, Hausmann OV, Shreffler WG, Korosec P, Knol EF. **The clinical utility of basophil activation testing in diagnosis and monitoring of allergic disease.** *Allergy*. 2015 Nov;70(11):1393-405

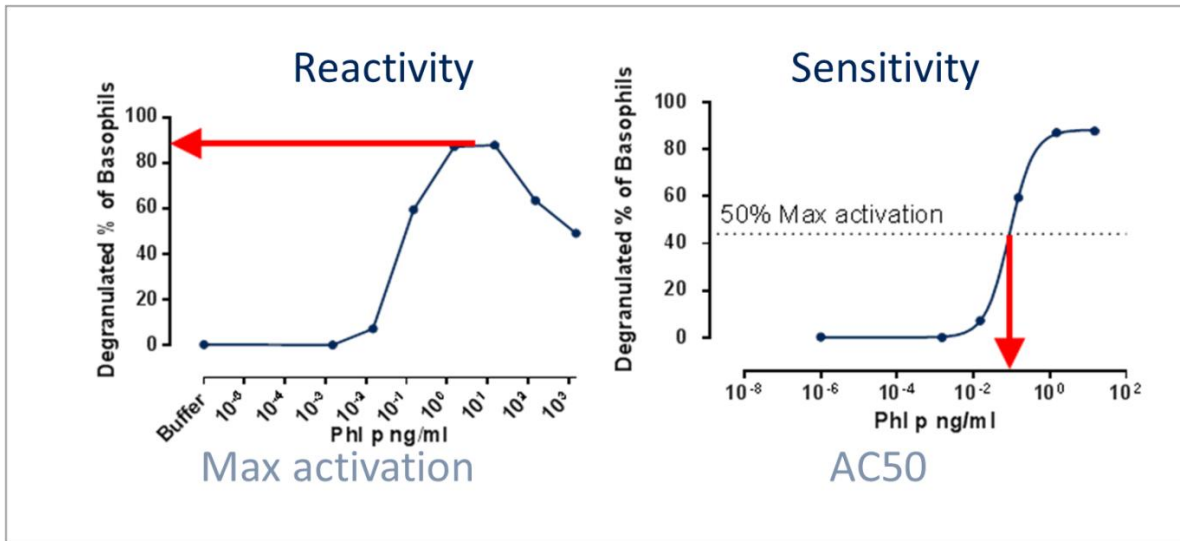


Figure 1. Dose response curves can be evaluated regarding reactivity or sensitivity

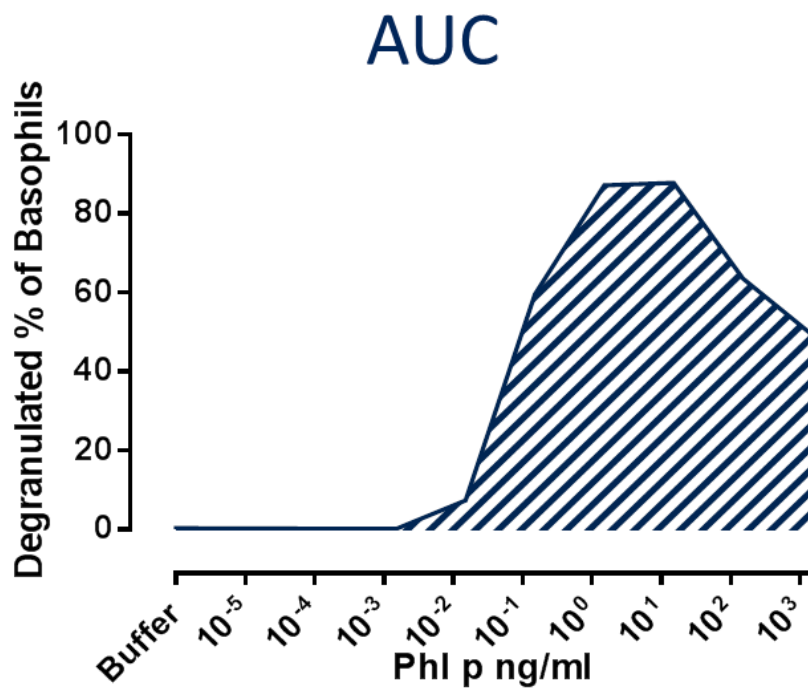


Figure 2. Combined values of reactivity and sensitivity is calculated as Area Under Curve AUC (log concentration)

Uporabnost BAT pri preobčutljivosti za strup kožekrilcev: napoved teže reakcije

Julij Šelb, dr med. Klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik

Edini konsistentni napovedni dejavnik teže sistemske reakcije pri alergiji za strup kožekrilcev, je bazalna triptaza (1). Vendar je limitacija tega testa, da je zgornja vrednost normale (11,4 mg/L) le redko (< 8 % (2) oz. < 15 % (3)) presežena. Nedavno objavljena raziskava (3) je pokazala, da s pomočjo za alergen specifičnih imunoloških faktorjev (merjenje serumskih IgE protiteles proti strupu ose/čebele, serumskih IgE protiteles proti rekombinantnim komponentam strupa ose/čebele, test aktivacije bazofilcev (BAT) s strupom ose/čebele in kožni testi s strupom ose/čebele), če jih interpretiramo v smislu pozitivnega/negativnega rezultata, ne ločujejo med različnimi stopnjami alergijske reakcije (asimptomatska senzibilizacija vs. velika lokalna reakcija vs. sistemska reakcija).

Po drugi strani je bilo pri alergiji za druge povzročitelje (predvsem alergija za oreščke (4,5) in alergija za mleko(6) pri otrocih) pokazano, da kvantitativne vrednosti različnih imunoloških faktorjev lahko ločujejo med bolniki z asimptomatsko senzibilizacijo in sistemsko reakcijo; nadalje je bilo za BAT pokazano da lahko ločuje med različnimi stopnjami sistemske reakcije (vrednosti BAT-a so bile signifikantno višje pri bolnikih, ki so imeli po zaužitju alergena sistemska reakcijo (težje oblike sistemske reakcije) v primerjavi z bolniki, ki so bili na alergen le senzibilizirani (prisotnost IgE protiteles proti alergenu dokazana z različnimi imunološkimi testi) in po zaužitju alergena klinično očitne reakcije niso imeli (oz. so imeli blažjo obliko sistemske reakcije)).

Z namenom razjasnitve vpliva različnih imunoloških dejavnikov (predvsem testa aktivacije bazofilcev), na napoved resnosti alergijske reakcije in na napoved same teže sistemske reakcije po piku kožekrilcev, smo 107 bolnikom (51,6 % moških, mediana starost = 41 let (IQR = 27 let)), ki so po piku kožekrilca iz družine Hymenoptera, doživeli alergično reakcijo (28 je imelo alergijsko reakcijo po piku čebele, 79 je imelo alergijsko reakcijo po piku ose/sršena) in so bili senzibilizirani le na enega izmed strupov obeh kožekrilcev (torej le na strup čebele oz. le na strup ose) ter bili t.i. 'na BAT odzivni bolniki' (> 15 % odziv po stimulaciji z anti-FcεRI protitelesi), naredili test aktivacije bazofilcev z odgovarjajočim strupom in korelirali odziv na BAT-u s težo reakcije. Test aktivacije bazofilcev smo naredili s 4-imi koncentracijami ustreznega (tistega na katerega je bil bolnik senzibiliziran) strupa. Z namenom predstavitve odziva testa aktivacije bazofilcev z eno številko smo izračunali površino pod krivuljo vseh 4-ih logaritmsko transformiranih koncentracij. Površino pod krivuljo smo izračunali s pomočjo trapezoidnega pravila.

Če smo bolnike s sistemska reakcijo primerjali z bolniki z veliko lokalno reakcijo, so imeli prvi statistično značilno ($p < 0.05$) višji BAT-AUC, kot drugi. Ta razlika je izvirala iz statistično značilno višjih vrednosti BAT-AUC-ja, med skoraj vsemi skupinami sistemske reakcije, če je bila le-ta ocenjena z lestvico po Muellerju in med skupino bolnikov z veliko lokalno reakcijo. Le bolniki, ki so po piku doživeli sistemska reakcijo Mueller I, niso imeli statistično značilno višjih vrednosti BAT-AUC-ja v primerjavi z bolniki, ki so po piku doživeli veliko lokalno reakcijo. Nadalje, če smo vrednosti teže alergijske reakcije številsko spremenili (velika lokalna reakcija = 1, sistemska reakcija Mueller I = 2, ..., sistemska reakcija Mueller IV = 5) in korelirali te številsko spremenjene vrednosti teže alergijske reakcije z vrednostmi BAT-AUC-ja smo dobili statistično značilno ($p = 0.002$) korelacijo.

V trenutni raziskavi smo pokazali, da BAT-AUC lahko ločuje med bolniki s sistemska in lokalno reakcijo po piku kožekrilca ter da višina BAT-AUC-ja korelira s težo alergijske reakcije po piku kožekrilca. Do podobnih zaključkov so prišli raziskovalci tudi pri drugih oblikah alergijskih bolezni (alergija za oreščke in alergija na mleko (4,5,6)). Odkrito dejstvo bi znalo biti uporabno pri bolnikih, ki so doživeli anafilaktično reakcijo po piku kožekrilca,

le-tega niso prepoznali, ter so senzibilizirani tako na strup ose, kot tudi na strup čebele. V takih primerih, ki v večini (90 %) predstavljajo sistemsko reakcijo za strup enega in asimptomatsko senzibilizacijo za strup drugega kožekrilca, bi lahko z uporabo razmerja med BAT-AUC-ja dobljenega s strupi obeh kožekrilcev, določili na katerega je bolnik dejansko alergičen in s strupom katerega bo potekala imunoterapija.

Reference:

1. Ruëff F, Przybilla B, Biló MB, et al. Predictors of severe systemic anaphylactic reactions in patients with Hymenoptera venom allergy: importance of baseline serum tryptase—a study of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology Interest Group on Insect Venom Hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(5):1047-1054. doi:10.1016/j.jaci.2009.08.027.
2. Haeberli G, Brönnimann M, Hunziker T, Müller U. Elevated basal serum tryptase and hymenoptera venom allergy: Relation to severity of sting reactions and to safety and efficacy of venom immunotherapy. *Clin Exp Allergy*. 2003;33(9):1216-1220. doi:10.1046/j.1365-2222.2003.01755.x.
3. Sturm GJ, Kranzelbinder B, Schuster C, et al. Sensitization to Hymenoptera venoms is common, but systemic sting reactions are rare. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(6):1635--43.e1. doi:10.1016/j.jaci.2013.10.046.
4. Santos AF, Du Toit G, Douiri A, et al. Distinct parameters of the basophil activation test reflect the severity and threshold of allergic reactions to peanut. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(1):179-186. doi:10.1016/j.jaci.2014.09.001.
5. Santos AF, Douiri A, Becares N, et al. Basophil activation test discriminates between allergy and tolerance in peanut-sensitized children. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;134(3):645-652. doi:10.1016/j.jaci.2014.04.039.
6. Ford LS, Bloom K a, Nowak-Węgrzyn AH, Shreffler WG, Masilamani M, Sampson H a. Basophil reactivity, wheal size, and immunoglobulin levels distinguish degrees of cow's milk tolerance. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(1):180-6-3. doi:10.1016/j.jaci.2012.06.003.
7. Korošec P, Žiberna K, Šilar M, et al. Immunological and clinical factors associated with adverse systemic reactions during the build-up phase of honeybee venom immunotherapy. *Clin Exp Allergy*. 2015;45(10):1579-1589. doi:10.1111/cea.12582.
8. Hoffmann HJ, Santos AF, Mayorga C, et al. The clinical utility of basophil activation testing in diagnosis and monitoring of allergic disease. *Allergy*. 2015;70(11):1393-1405. doi:10.1111/all.12698.
9. Šelb J, Kogovšek R, Šilar M, Košnik M, Korošec P. Improved recombinant Api m1 and Ves v5 based IgE testing to dissect bee and yellow jacket allergy and their correlation with the severity of the sting reaction. *Clin Exp Allergy*. September 2015. doi:10.1111/cea.12639.
10. Eberlein B, Krischan L, Darsow U, Ollert M, Ring J. Double positivity to bee and wasp venom: improved diagnostic procedure by recombinant allergen-based IgE testing and basophil activation test including data about cross-reactive carbohydrate determinants. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130(1):155-161. doi:10.1016/j.jaci.2012.02.008.
11. Santos AF, James LK, Bahnson HT, et al. IgG4 inhibits peanut-induced basophil and mast cell activation in peanut-tolerant children sensitized to peanut major allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(5):1249-1256. doi:10.1016/j.jaci.2015.01.012.

Uporabnost BAT pri preobčutljivosti za strup kožekrilcev: napoved zapletov imunoterapije

Asist. Peter Kopač, dr med. Klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik

Uvod

3% populacije razvije sistemsko alergijsko reakcijo po piku kožekrilca (čmrlj, čebele, osa, sršen). Zaenkrat je edini vzročni način zdravljenja specifična imunoterapija s strupom kožekrilca (ang: venom immunotherapy – VIT). Stranski učinki VIT so lahko velika lokalna reakcija in sistemsko alergijska reakcija (SAR). Po podatkih iz literature se SAR pojavi pri 16-40% pacientih zdravljenih s strupom čebele in 4-19% pacientih zdravljenih s strupom ose. Glavni rizični faktorji sta povišana bazalna triptaza in višja specifična senzitivnost bazofilcev. V večini primerov lahko z VIT nadaljujemo z dodatno premedikacijo z antihistaminiki in prilagoditvijo protokola VIT. Skrajšamo intervale aplikacije VIT in postopno zvišamo odmerke strupa iz 100 mcg na 200 mcg. Obstaja pa določena podskupina pacientov, pri katerih so SAE med VIT tako pogosti in težki, da jim kljub prilagoditvi protokola ne uspemo uvesti zdravljenja. Ti pacienti so še dodatno bolj ogroženi za težko sistemsko alergijsko reakcijo po piku kožekrilca na terenu.

Omalizumab je monoklonsko anti IgE protitelo ki se uporablja v zdravljenju težke alergijske astme in kronične urtikarije. Omalizumab znižuje koncentracijo celokupnih IgE v plazmi, s tem pa se posredno zmanjša tudi izraženost FCRI receptorja na površini bazofilcev in le –ti postanejo manj senzibilni.

V študijah so dokazali učinkovitost zdravljenja z omalizumabom pri pacientih z idiopatsko anafilakso, pri premagovanju stranskih učinkov med imunoterapijo pacientov alergičnih za hrano, prav tako je opisana učinkovitost zdravljenja z omalizumabom pri pacientih z mastocitozo in SAE med VIT.

Metode:

Analizirali smo potek vseh VIT ki smo jih uvedli v času maj 2005 – junij 2016. Primerjali smo kateri klinični parametri (spol, starost, teža reakcije, uporaba zdravil beta blokatorjev, ACE zaviralcev) in imunološki parametri (bazalna triptaza, specifične IgE strup, čebele, ose, rekombinantni IgE rApi m1, m10, test aktivacije bazofilcev) so povezani z SAE med VIT. Paciente ki jim nismo mogli uvesti VIT smo zdravili z omalizumabom in ponovno poskusili uvesti VIT.

Rezultati

V času maj 2005 – junij 2016 smo uvedli 1952 VIT (752 strup čebele, 1200 strup ose). VIT s strupom čebele se je zapletla s SAR v 20,1%, VIT s strupom ose pa v 1,8%. VIT s strupom čebele se je v 3,1 % tako zapletal da kljub prilagoditvi protokola nismo mogli nadaljevati, VIT s strupom ose pa smo lahko vedno nadaljevali.

Pacienti z SAR med VIT s strupom čebele so imeli statistično višjo povprečno bazalno triptazo, vendar razlika ni tako velika da bi bila uporabna v klinični praksi. Pomembno pa je bil višji odgovor bazofilcev po stimulaciji z čebeljim strupom (Fig 1). Pri pacienti z SAR med VIT s strupom ose teh razlik nismo opazovali.

Pri 23 pacientih nismo uspeli uvesti VIT s strupom čebele zaradi ponavljajočih se SAR. 11/23 pacientov smo zdravili z omalizumabom v uvodni in nadaljevalni fazi VIT. Senzitivnost bazofilcev smo ocenjevali z aktivacijo pri koncentraciji čebeljega strupa 0,1 mcg/ml. Pri pacientih ki so prejeli omalizumab v odmerku 300 mg / 2 tedna 3x pred uvodno fazo VIT smo lahko uvedli VIT po standardni hitri »ultra rush« shemi brez zapletov. Imunološko smo opazali upad senzitivnosti bazofilcev med zdravljenjem z omalizumabom, kar je koreliralo s

kliničnim uspehom – uvedbo VIT brez SAR. Samo pri 1/11 pacientu smo na lastno željo prekinili zdravljenje

Pri 10 pacientih smo nadaljevali z zdravljenjem z omalizumabom tudi v nadaljevalni fazi VIT. V nasprotju z pričakovanju pa v nadaljevalni fazi VIT pojavljali pri določenih pacientih SAR kljub zdravljenju z omalizumabom. Pojav SAR ni dobro koreliral z senzitivnostjo bazofilcev. So pa bile SAR blage in življenje ne-ogrožajoče. Zaradi pogostih SAR smo ukinili VIT pri 4/10 pacientih, 4/10 nadaljujejo VIT brez omalizumaba, pri 2/10 pa nadaljujemo VIT z omalizumabom.

Zaključek

Pri 3,1% pacientov VIT s strupom čebele ne moremo uvesti zaradi SAR. Pomembni rizični faktor za SAR med VIT so: zdravljenje s strupom čebele, višja bazalna triptaza, visoka specifična senzitivnost bazofilcev. Zdravljenje z omalizumabom zniža odzivnost bazofilcev ter omogoča varno uvodno fazo VIT, nadaljevalno fazo VIT pa smo lahko nadaljevali pri 60% pacientov.

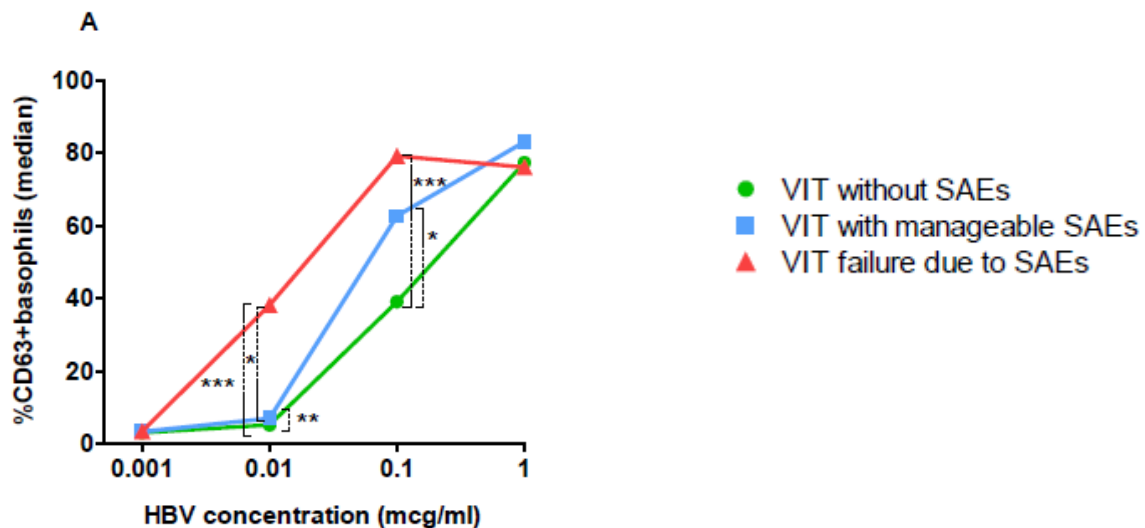


Fig 1: Senzitivnost bazofilcev je pomembno višja pri pacientih, kjer je imunoterapija potekala z zapleti, v primerjavi s pacienti kjer je imunoterapija potekala brez zapletov.

Priporočena literatura

1. Sturm GJ, Varga E, Roberts G, et al. EAACI Guidelines on Allergen Immunotherapy: Hymenoptera venom allergy. *Allergy* 2017
2. Ricciardi L. Omalizumab: A useful tool for inducing tolerance to bee venom immunotherapy. *Int J Immunopathol Pharmacol* [Internet] 2016 [cited 2016 Nov 28]; 10–2
3. Larenas-Linnemann D, Wahn U, Kopp M. Use of omalizumab to improve desensitization safety in allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* [Internet] 2014 [cited 2016 Aug 22]; 133: 937–937.e2
4. Jones JD, Marney SR, Fahrenholz JM. Idiopathic anaphylaxis successfully treated with omalizumab. *Ann Allergy Asthma Immunol* [Internet] 2008 [cited 2016 Aug 22]; 101: 550–1
5. Bonadonna P, Bonifacio M, Lombardo C, Zanotti R. Hymenoptera Allergy and Mast Cell Activation Syndromes. *Curr Allergy Asthma Rep* [Internet] 2016 [cited 2016 Sep 27]; 16: 5

Uporabnost testa aktivacije bazofilcev pri diagnostiki alergije za zdravila

asist. Tina Vesel Tajnšek, dr. med., spec. pediater. Služba za alergologijo, klinično imunologijo, revmatologijo, Univerzitetna pediatrična klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana

Številne so obravnave zaradi suma na alergijske reakcije na zdravila tako pri otrocih kot pri odraslih. Takojšnje alergijske reakcije na zdravila, posredovane s sIgE ali pa z drugimi mehanizmi, se pojavijo v 1 do 6 urah po zadnjem odmerku zdravila (najbolj tipično znotraj prve ure po prvem odmerku ponovnega prejemanja istega zdravila) in se pri najpogostejše pokažejo kot generalizirane urtikarije, angioedem, lahko pa tudi kot anafilaksija ali izolirana prizadetost dihal ali prebavil (1). Pozne reakcije na zdravilo so pogostejše kot takojšnje, pojavijo pa se kasneje, vsaj eno uro po prvem odmerku zdravila. Najpogostejše gre za z limfociti T posredovane preobčutljivostne reakcije, ki se običajno izrazijo z makulopapuloznim izpuščajem (MPE) ali pozno urtikarijo (2). Diagnostični postopek ob sumu na takojšnjo alergijo za zdravila sloni na klinični anamnezi, kožnih testih (KT) in določanju specifičnih IgE protiteles (sIgE). Žal pa se pogosto ti testi izkažejo za nezadostne tako v primeru takojšnjih, še bolj pa poznih alergičnih reakcij na zdravilo. Provokacijski test (PT) je sicer opredeljen kot zlati standard diagnostike ob sumu na alergijo za zdravila, ni pa vedno možna njegova izvedba (2, 3). Prednosti in omejitve diagnostičnih metod ob sumu na alergijo za zdravila so tudi v Tabeli 1.

Tabela 1. Prednosti in omejitve diagnostičnih metod pri sumu na alergijo na zdravila (2, 3)

Diagnostična metoda	Prednosti	Omejitve
sIgE	Ne povzročimo alergijske reakcije.	Na razpolago le za redka zdravila. Nizka senzitivnost, lahko vprašljiva specifičnost. Priporočeno le pri takojšnjih alergijskih reakcijah.
KT	Enostavnost izvedbe (pri odraslih), takojšen rezultat, visoka specifičnost. Kožni testi z BL so največkrat v pomoč pri potrjevanju takojšnjih reakcij.	Vprašljiv je prenos enake izvedbe KT kot je uporabljen pri odraslih na otroke, npr. uporaba enake koncentracije ali vbrizganja enake količine zdravila ob izvedbi intradermalnega KT. Za otroke so KT boleči. Pozni tip alergije potrdijo redkeje. Redko možnost povzročanja sistemske reakcije ob nanosu KT. Alergogenost zdravil, za katera vemo, da so imunogeni njihovi metaboliti, ne moremo preverjati s KT. Večurno testiranje, če upoštevamo protokol npr. glede BL. Ob prejemanju antihistaminikov in drugih imunosupresivnih zdravil lahko lažno negativni rezultati. Dermografizem moti testiranje. Možen nejasen rezultat. Za veliko zdravil ni znana diagnostična vrednosti.
PT	Negativna napovedna vrednost PT je za nekatera zdravila zelo visoka (npr. za BL je med 94 in 98%, za NSAR preko 96%).	Potreben je sprejem v bolnišnico. Obstaja možnost anafilaksije. Kontraindiciran pri življenju ogrožajočih reakcijah oziroma reakcijah s težkim in nepredvidljivim potekom kot so težke kožne reakcije ter sistemske reakcije s prizadetostjo notranjih organov oziroma hematološkimi manifestacijami ter ob prejemanju nekaterih zdravil (ACE inhibitorji, betablokatorji). Pri sumu na anafilaksijo je potrebno presojanje tveganja in koristi testiranja za vsakega posebej. Z nekaterimi anestetiki neizvedljiv.
BAT	Le odvzem krvi. Možna izvedba z različnimi zdravili. Ne povzročimo alergične reakcije. Lahko boljša senzitivnost in specifičnost kot pri sIgE.	Odvzem krvi v času, da mogoča kmalu transport v imunološki laboratorij. Redko problem neodzivnosti bazofilcev na pozitivno kontrolo. Različne metode, različna uporabnost različnih markerjev pri različnih zdravilih, različna opredelitev pozitivnega rezultata. Možnost lažno pozitivnega rezultata.

Legenda: sIgE- specifični IgE; KT- kožni test; PT- provokacijski test; BAT- test aktivacije bazofilcev; BL- betalaktamski antibiotiki, NSAR- nesteroidni antirevmatiki.

V želji po testih, s katerimi bi brez tveganja (le z odvzemom krvi) lahko potrdili ali ovrgli sum, da je določeno zdravilo sprožilo določeno reakcijo, je v razvoju več različnih in vitro

testov, med njimi je tudi test aktivacije bazofilcev. Test aktivacije bazofilcev (BAT) je glede na literaturo uporaben diagnostični test pri takojšnjih alergijskih reakcijah na zdravila, predvsem v primeru suma na alergijo za živčno mišične relaksante (NMBAs- neuro muscular blocking agents) (4, 5), antibiotike (6, 7, 8), pa tudi nesteroidne antirevmatike (NSAR) (9), jodna kontrastna sredstva (10) in druga zdravila. Senzitivnost BAT za peniciline je bila med 22 % in 55 %, za klavulansko kislino do 52,7 %, specifičnost pa dobra, med 79 % to 96 %. Senzitivnost BATa za NMBA je bila med 64 in 85, 7 % s specifičnostjo med 93 % in 100 %, višja za rokuronij. Nižja senzitivnost je bila zabeležena pri kinolonih ter NSAR (4-11). Opisane študije so vključevale odrasle bolnike in ne otrok. Nekatere študije so vključile majhne skupine bolnikov in/ali ne kontrolnih skupin. Diagnostična uporabnost BATa je lahko variirala tudi zaradi različnih mehanizmov takojšnjih reakcij po zdravljenih in tudi ob različnih uporabljenih markerjev aktivacije bazofilcev, npr. po anafilaksijah po cefazolinu se je bolje izkazal marker CD203c v primerjavi s CD63 (11). Kljub temu, da obstaja komercialno dostopen test, protokoli izvajanja preiskave niso standardizirani med različnimi laboratoriji glede markerjev, postopka in koncentracij zdravil. Podobno kot velja za druge diagnostične metode iskanja takojšnje alergije za zdravila se s časom zniža sIgE za zdravila in je možnost lažno negativnega rezultata večja, če se izvede oddaljeno od časa reakcije (12).

BAT se izvede glede na priporočila pri diagnostiki alergijskih reakcij na BL in NMBAs in se dopolnjuje z drugimi in vitro testi (12). Izvedba BAT je priporočena tudi pri diagnostiki alergijskih reakcij na pirazolone, florokinolone in rentgenska kontrastna sredstva. Pri življenje ogrožajočih reakcijah ali pri osebah, ki osebah, opredeljene kot rizične, je priporočena izvedba BATa pred in vivo testi (2, 12). BAT je priporočen pred kožnim testom v primeru, če izvedba kožnih testov ni možna ali jih otrok zavrne. Pozitiven rezultat potrди alergijo za zdravilo le v primeru prepričljive anamneze ali/in drugih rezultatov testiranja (2).

Za določanje BAT pri otrocih smo se na Univerzitetni pediatrični kliniki v Ljubljani obračali na Imunološki laboratorij Univerzitetne klinike za pljučne bolezni in alergologijo, Golnik ali na Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. V obeh ustanovah so opredeljevali aktivacijo bazofilcev preko CD63 z računanjem stimulacijskega indeksa (SI), v prvi po lastni metodi, v drugi pa z metodo po Buhlmannu.

Najštevilčnejše izkušnje pri določanju aktivacije bazofilcev razvijamo pri otrocih z alergijo za BL. V skupini 57 otrok z takojšnjo alergijo za BL so otroci z alergijo za BL imeli višjo aktivacijo bazofilcev kot tolerantni nanje in sicer za amoksicilin (AX), penicilin V (PENV) in cefuroksim (CU). Celo otroci z pozno alergijo za BL so imeli višjo aktivacijo bazofilcev z AX in AX z klavulansko kislino (AX-cl) kot tolerantni nanje (13). Na preplet takojšnje in pozne alergijske reakcije na zdravilo smo sicer pri otrocih vajeni že zaradi manj jasne anamneze, lahko pa jo dokažemo tudi z diagnostičnimi preiskavami (npr. otroci z jasnimi poznimi alergijskimi reakcijami imajo pozitivne teste metod značilne za takojšnje reakcije) (14, 15). V naši raziskavi otrok za alergijo za BL je ob $SI > 1,7$ za AX, $> 1,8$ za AX-cl in $> 1,9$ za PENV diagnostična senzitivnost izračunana z ROC analizo dosegla 62 % za AX, 63 % za AX-cl, 31 % za PENV, diagnostična specifičnost pa 93 % za AX in AX-cl ter 95 % za PENV (13). V zadnjih letih pa smo ugotovili, da lahko nekateri otroci tudi ob $SI > 2$ tolerirajo PENV, AX in CU (podatki (podatki Službe za alergologijo, klinično imunologijo, revmatologijo- SARKI).

Če je bila uporabljena komercialno dostopna metoda BAT, je bil pozitiven rezultat BAT z amoksicilin v skupini 112 otrok s sumom na alergijo za amoksicilin le pri štirih otrocih, s tem, da je eden od njih prestal PT z amoksicilinom brez težav (podatki SARKI). BAT se ni izkazal

tudi v ločevanju otrok za alergijo ali toleranco na ceftriakson, ne glede na uporabljeno metodo (16).

Pri opredeljevanju alergije za glukokortikoide (metilprednizolon (MP), hidrokortizon (HC), deksametazon (DX), flutikazon (FL)) pri otrocih je tudi BAT ločil med alergičnimi in tolerantnimi, vendar smo zaznali tudi nekaj pozitivnih rezultatov glede BAT z DX in FL brez klinične pomembnosti (17). Izvedbo BAT naročimo tudi ob obravnavi otrok po perioperativni anafilaksiji, posebej če so otroci prejeli NMBAs. Tako je 78% otrok z pozitivnimi kožnimi testi na NMBAs imelo $SI > 2$ za NMBAs, BAT pa je prikazal manjši obseg navzkrižne alergije, o čemer poročajo tudi drugod (18). Pozitivni rezultati BAT na NMBAs menim da nam je bila v pomoč opredelitvi alergije za zdravila pri otrocih z dermografizmom. Otroke kar obremeni tudi obsežnost diagnostičen postopek po perioperativni anafilaksiji, zato smo BAT omogočili tudi za druga zdravila, npr. za propofol, benzodiazepini in opioide s posamičnimi pozitivnimi rezultati- npr. za midazolam (19). Redko smo zaznali pozitiven rezultat BAT-a pri otrocih z alergijo za NSAR (med leti 2014 in 2017 pri 9 otrocih) (podatki SARKI), ponovno pa je bilo nekaj lažno pozitivnih rezultatov.

Kot zaključek- BAT je torej dodatno diagnostično orodje pri diagnostiki ob sumu predvsem na resno takojšnjo alergijsko reakcijo na nekatera zdravila. Pri otrocih imamo zaenkrat spodbudne izkušnje ob diagnostiki alergije za NMBAs in glukokortikoide (MP, HC, DX). Drži tudi, da je možna alergija za zdravilo ob negativni aktivaciji bazofilcev in tudi da je možna toleranca otroka na zdravilo kljub višji aktivaciji bazofilcev. Zaželeno pa je nadaljevanje raziskav s tega področja v smislu optimiziranja testnih protokolov, interpretacije rezultata testa in določitve kje natančno je mesto BATA v diagnostičnem postopku ob sumu na alergijo za zdravila. Pri otrocih z enostavnimi poznimi kožnimi reakcijami po BL ostaja glavni diagnostični test provokacijski test, v primeru takojšnjih reakcij po zdravljenih pa poskušamo z kožnimi pred provokacijskimi testi.

Literatura:

1. Bircher AJ, Scherer Hofmeier K. Drug hypersensitivity reactions: Inconsistency in the use of the classification of immediate and nonimmediate reactions. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129:263–4.
2. Gomes ER, Brockow K, Kuyucu S, Saretta F, Mori F, Blanca-Lopez N, et al; ENDA/EAACI Drug Allergy Interest Group. Allergy Drug hypersensitivity in children: report from the pediatric task force of the EAACI Drug Allergy Interest Group. *Allergy*. 2016;71(2):149-61.
3. Demoly P, Adkinson NF, Brockow K, Castells M, Chiriac AM, Greenberger PA, et al. International Consensus on drug allergy. *Allergy*. 2014;69(4):420-37.
4. Monneret G, Benoit Y, Debard AL, Gutowski MC, Topenot I, Bienvenu J: Monitoring of basophil activation using CD63 and CCR3 in allergy to muscle relaxant drugs. *Clin Immunol* 2002; 102: 192–199.
5. Ebo DG, Bridts CH, Hagendorens MM, Mertens CH, De Clerck LS, Stevens WJ: Flowassisted diagnostic management of anaphylaxis from rocuronium bromide. *Allergy* 2006; 61: 935–939.
6. Sanz ML, Gamboa PM, Antepara I, Uasuf C, Vila L, Garcia-Aviles C, Chazot M, De Weck AL: Flow cytometric basophil activation test by detection of CD63 expression in patients with immediate-type reactions to betalactam antibiotics. *Clin Exp Allergy* 2002; 32: 277–286.
7. Gamboa PM, Garcia-Aviles MC, Urrutia I, Antepara I, Esparza R, Sanz ML: Basophil activation and sulfidoleukotriene production in patients with immediate allergy to betalactam antibiotics and negative skin tests. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2004; 14: 278–283.
8. Seitz CS, Brocker EB, Trautmann A: Diagnostic testing in suspected fluoroquinolone hypersensitivity. *Clin Exp Allergy* 2009; 39: 1738–1745.
9. Korosec P, Mavsar N, Bajrovic N, Silar M, Mrhar A, Kosnik M: Basophil responsiveness and clinical picture of acetylsalicylic acid intolerance. *Int Arch Allergy Immunol* 2011; 155: 257–262.
10. Trcka J, Schmidt C, Seitz CS, Brocker EB, Gross GE, Trautmann A: Anaphylaxis to iodinated contrast material: nonallergic hypersensitivity or IgE-mediated allergy? *AJR Am J Roentgenol* 2008; 190: 666–670.
11. Uyttebroek AP, Sabato V, Cop N, et al. Diagnosing cefazolin hypersensitivity: Lessons from dual-labeling flow cytometry. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2016; 4(6):1243–5.
12. Mayorga C, Celik G, Rouzair P, et al. In vitro tests for drug hypersensitivity reactions: an ENDA/EAACI Drug Allergy Interest Group position paper. *Allergy* 2016; 71: 1103–34.

13. Vesel T, Šilar M, Koren Jeverica, Accetto M, Toplak N, Košnik M, et al. Importance of basophil activation testing in children with suspected betalactame allergy. In: Programme and abstract book EAACI 2015; Barcelona, Španija. Dostopno na: www.eaaci.org/images/files/Abstract_Books/2015/EAACI_2015.pdf.
14. Hjortlund J, Mortz CG, Skov PS, Bindslev-Jensen C. Diagnosis of penicillin allergy revisited: the value of case history, skin testing, specific IgE and prolonged challenge. *Allergy*. 2013;68:1057–64.
15. Vesel T, Šilar M, Koren Jeverica A, Accetto M, Toplak N, Arnež M, et al. Alergija na antibiotike v pediatriji. In: Beović B, Sterle F, Tomažič J, editors. *Novosti v infektologiji, Neželeni učinki protimikrobnih zdravil: zbornik predavanj*; 2013 Mar 22.; Ljubljana, Slovenija. V Ljubljani: Sekcija za protimikrobno zdravljenje SZD; 2013. p.121-9.
16. Vesel T, Koren Jeverica A, Šilar M, et al. Suspected ceftriaxone hypersensitivity in children is difficult to confirm. In: Programme and abstract book DHM 2018; Amsterdam, Nizozemska. Dostopno na: https://www.eaaci.org/images/eaaci-meetings/focused/DHM2018/DHM_2018_-_Abstract_text_-_all.pdf
17. Vesel T, Koren Jeverica A, Šilar M, et al. Hypersensitivity to glucocorticoids in children. Abstrakt. Predstavljeno na DHM 2014.
18. Eberlein B, Wigand S, Lewald H, et al. Utility of basophil activation testing to assess perioperative anaphylactic reactions in real-world practice. *Immun Inflamm Dis* 2017;5(4):416-20.
19. Vesel T, Koren Jeverica A, Šilar M, et al. Allergic reactions during general anaesthesia in Slovenian children. Abstrakt. Predstavljeno na DHM 2014.

Novi metodološki BAT pristopi: fluorescenčno označevanje alergenov in multiparametrična BAT analiza

dr. Ana Koren, univ. dipl. bioteh. Laboratorij za klinično imunologijo in molekularno genetiko, Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik

Uvod

Test aktivacije bazofilcev (angl. Basophil Activation Test, BAT) je *in vitro* celični test za ugotavljanje alergogene reaktivnosti na specifični alergen. Aktivacijo bazofilcev diagnostično merimo s pretočno citometrijo, kjer bazofilce označimo s fluorescenčno označenimi protitelesi. V našem laboratoriju za detekcijo bazofilcev uporabljamo kombinacijo označevalcev CD123+ in HLA-DR-, za ugotavljanje degranulacije (aktivacije) bazofilcev pa lizosomski membranski glikoprotein CD63. BAT predstavlja uporabno orodje za detekcijo takojšnjih preobčutljivostnih reakcij, vključno z alergijo za strupe kožekrilcev. Pomembno omejitev pri uporabi testa BAT v diagnostiki alergijskih bolezni predstavlja hkratno testiranje različnih alergenov, ki zviša ceno, podaljša izvedbo in poveča delovno intenzivnost metode. Označevanje alergenov s fluorescentnimi delci bi lahko predstavljalo povsem nov pristop za multiparametrično preverjanje alergogene aktivnosti s pretočno citometrijo, ki bi omogočal analizo aktivacije bazofilcev z različnimi alergeni v manjšem številu testnih epruvet. V predstavljeni raziskavi smo poglobljeno preučili alergena čebeljega strupa fosfolipazo A2 (Api m 1) in hialuronidazo (Api m 2) označili s Qdot nanokristali, ki po ekscitaciji emitirajo fluorescenco različnih valovnih dolžin. Valovna dolžina fluorescence je odvisna od velikosti Qdot nanokristala. Za vezavo Qdota na protein sta na voljo dve različni površinski kemiji: vezava lahko poteka preko karboksilne skupine ali preko amino skupine. Glavna razlika med obema načinoma vezave je ta, da amino Qdot nanokristal vsebuje vezni protein (PEG), medtem ko karboksil Qdot nanokristal ne vsebuje veznega proteina in se na tarčni protein veže direktno. Namen raziskave je bil preveriti možnost uporabe označenih alergenov v multiparametrični (multipleks) BAT analizi.

Metode

nApi m 1 (Latoxan, Francija) in rApi m 2 (Medicinska fakulteta Dunaj) smo konjugirali s Qdot® 705 ali 800 ITK™ amino (PEG) ali Qdot® 705 ali 800 ITK™ karboksil nanokristali. IgE reaktivnost Qdot-označenih alergenov smo preverili s testom imunskega odtisa (imunoblot), kjer smo kot primarno protitelo uporabili serumske vzorce bolnikov preobčutljivih za strup čebele, ki imajo prisotna protitelesa IgE proti Api m 1 in Api m 2. Alergogeno aktivnost smo preverili s testom BAT, kjer smo za označevanje bazofilcev in spremljanje aktivacije uporabili protitelesa CD123-PE/HLA-DR-APC/CD63-FITC. Fluorescenco Qdot705 smo merili s kombinacijo filtrov 670LP (eks. 488nm), Qdot800 pa s 780/60 (eks. 488nm) (**Slika 1**). Vzorce smo analizirali s pretočnim citometrom FACS Canto II. V zadnjem delu raziskave smo uporabnost Qdot-označenih alergenov za multiparametrično BAT analizo preverili pri 12 bolnikih s preobčutljivostno reakcijo za strup čebele in pri 3 kontrolah, kjer je stimulacija krvi z amino Qdot 705-Api m 1 ter amino Qdot 800-Api m 2 potekala v ločenih epruvetah, nato pa smo vzorce pred dodatkom protiteles združili in analizirali kot multipleks.

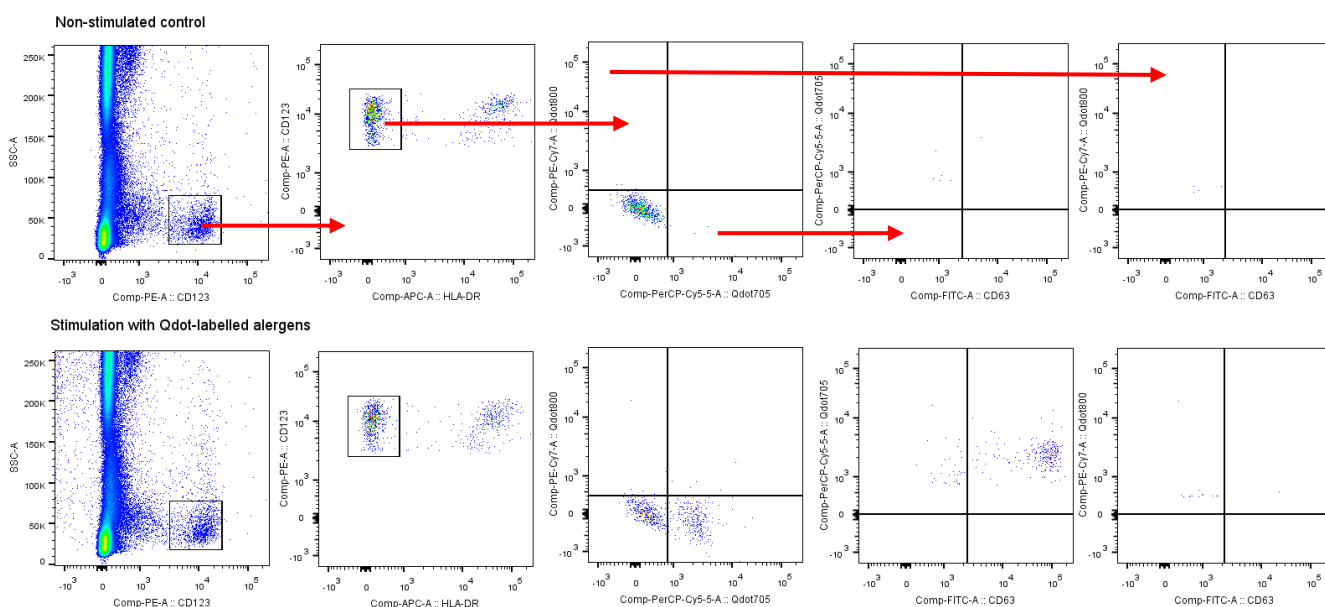
Rezultati

Rezultati analize imunskega odtisa so pokazali, da imajo Qdot-označeni alergeni IgE reaktivnost, le-ta je ohranjena tako v primeru konjugacije alergena na Qdot preko karboksilne kot tudi preko amino skupine. Vezava IgE na Qdot-označen alergen je alergen-specifična, saj Qdot nanokristali sami po sebi niso vezali serumskih IgE. V nadaljevanju smo preverili ali lahko Qdot-označeni alergeni prekrizajo površinske IgE in sprožijo degranulacijo bazofilcev

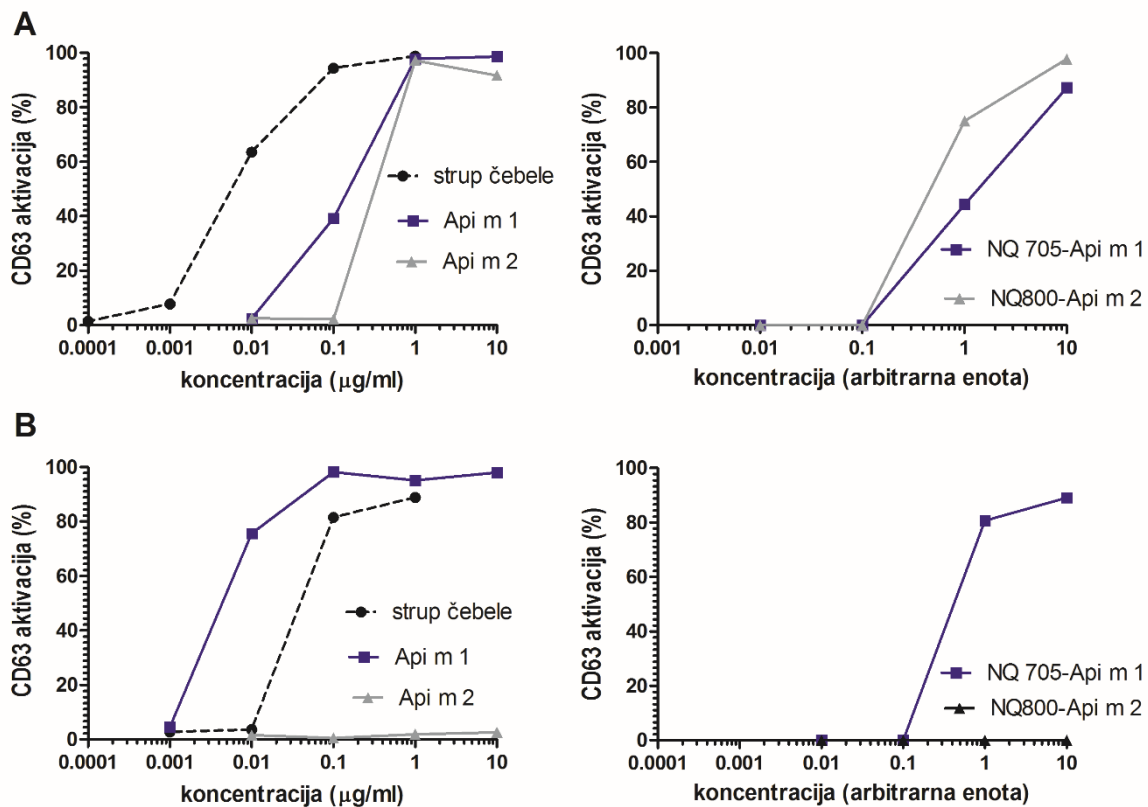
pri bolnikih s preobčutljivostno reakcijo za strup čebele. Ugotovili smo, da je alergena aktivnost (sposobnost degranulacije) ohranjena samo v primeru vezave alergena na Qdot preko amino skupine, ne pa tudi preko karboksilne skupine. Amino Qdot vezan alergen smo nato uporabili v multipleks testu aktivacije bazofilcev, kjer smo rezultat običajne BAT analize primerjali z rezultatom multipleks BAT analize: V BAT analizi je bilo 4/12 bolnikov pozitivnih za Api m 1 (enojno pozitivni), 8/12 bolnikov je bilo pozitivnih za Api m 1 in Api m 2 (dvojno pozitivni). Vse 3 kontrole so bile negativne za oba testirana alergena. V multipleks BAT analizi smo uspešno potrdili ujemanje z rezultatom BAT pri 13/14 bolnikih in 3/3 kontrolah s primerljivimi krivuljami odziva na alergen (**Slika 2**).

Zaključki

Označevanje alergenov Api m 1 in Api m 2 s Qdot nanokristali ne vpliva na njihovo IgE reaktivnost. V nasprotju s tem je sposobnost prekrivanja IgE in alergena aktivnost ohranjena samo v primeru označevanja z amino (PEG) Qdot nanokristali. Fluorescenčno označevanje alergenov predstavlja povsem nov pristop, ki omogoča sočasno BAT analizo z večimi alergeni.



Slika 1: Prikaz analize podatkov pri multipleks testu aktivacije bazofilcev (BAT). Prikazan je primer bolnika s pozitivnim odzivom na Api m 1 in negativnim odzivom na Api m 2.



Slika 2: Krivulje odziva pri navadni in multipleks BAT analizi pri (A) enojno pozitivnem (Api m 1+) in (B) dvojno pozitivnem (Api m 1+ Api m 2+) bolniku.

Reference

Koren A, Lunder M, Molek P et al. Fluorescent labelling of major honeybee allergens nApi m 1 and rApi m 2 with Quantum dots and its application in multiplex basophil activation test. Allergy, Supplement, European Academy of Allergy and Clinical Immunology Congress, 26-30 May 2018, Munich. 2018; 73(s105):126.

Mast cell activation test (MAT): a novel approach in the diagnosis of allergic disease and anaphylaxis

Rajia Bahri, PhD. Division of Musculoskeletal and Dermatological Sciences & Manchester Collaborative Centre for Inflammation Research (MCCIR), School of Biological Sciences, University of Manchester, Manchester, United Kingdom

Imunofenotipizacija v BAL: metodologija, markerji in analiza

Doc.dr. Matija Rijavec, univ.dipl.mikr. Laboratorij za klinično imunologijo in molekularno genetiko, Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik

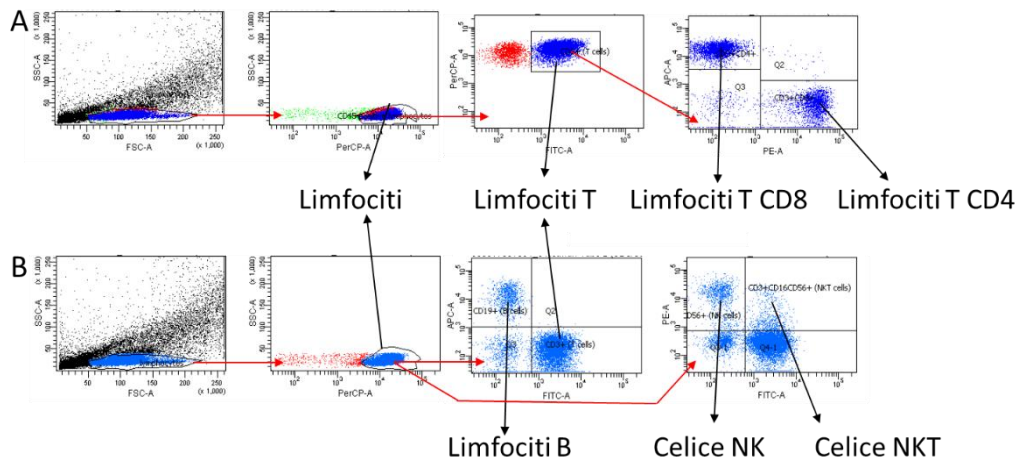
Imunofenotipizacija s pretočnim citometrom je metoda, s pomočjo katere določamo deleže različnih levkocitnih populacij, najpogosteje limfocitne podvrste. Bronhoalveolarni izpirek oz. lavaža (BAL) je minimalno invaziven postopek, ki nam omogoča vpogled na imunološko dogajanje v pljučih in osnovno patofiziologijo veliko kroničnih in akutnih bolezni [1,2]. Velik del našega razumevanja o vlogi imunskih celic v pljučih, kjer poleg anatomskih ovir predstavljajo pomemben obrambni mehanizem, izhaja ravno iz preučevanja imunskih celic v BAL-u [1-4]. Določitev deleža različnih limfocitnih podvrst v BAL-u je v pomoč pri postavitvi diagnoze različnih pljučnih bolezni, kot so intersticijske pljučne bolezni, okužbe in malignosti. Za različne bolezni je značilna specifična imunska celična sestava BAL-a, zato se je uporaba pretočne citometrije izkazala za zelo informativno pri določanju celičnih podvrst, kjer z uporabo specifičnih protiteles proti markerjem celične površine (angl. cluster of differentiation, CD), določamo specifične limfocitne podvrste [1-3]. Kot raziskovalno orodje se je imunofenotipizacija v BAL-u izkazala kot koristna za ugotavljanje celičnega in humoralnega dogajanja v pljučih, ter na ta način pripomogla k razjasnitvi patogeneze različnih pljučnih bolezni [1-4].

Celična sestava BAL-a je mnogo bolj heterogena kot celična sestava periferne krvi. Glavne celične populacije BAL-a predstavljajo makrofagi, nevtrofilci, eozinofilci, eritrociti in limfociti, v manjšem deležu so prisotni še mastociti, epitelne celice, plazmatke, Langerhansove celice, megakariociti, eritroidni prekurzorji, endotelijske celice, in druge. Med vnetjem se število epitelnih celic lahko zelo poveča. V BAL-u so pogosto prisotne tudi nepljučne snovi (material, ki ne izhaja iz pljuč) kot so nepatogene glive, smucec, ogljikovi pigmenti, železovci, dlake, mineralna vlakna, granule s cvetnim prahom, zrnca škroba in rastlinske celice. Velika heterogenost celic in prisotnost različnih snovi lahko vpliva na razpršitev svetlobe pri analizi specifičnih populacij (npr. limfocitnih podvrst), kar še dodatno otežuje analizo s pretočnim citometrom [1-2].

V BAL-u pri normalni, zdravi osebi predstavljajo alveolarni makrofagi več kot 85 % vseh celic, 10 do 15 % je limfocitov, tem sledijo nevtrofilci (< 4 %) in eozinofilci (<3 %), medtem ko je delež ostalih imunskih celic še nižji. Delež limfocitov T pri odrasli zdravi osebi so v BAL-u podobne kot v periferni krvi, torej približno 70 do 95 % limfocitov T, 35 do 65 % limfociti T CD4, 20 do 40 % limfociti T CD8. Medtem, ko je limfocitov B in celic NK v BAL-u manj kot v krvi, običajno manj ko 5% [1-3].

Za izvedbo imunofenotipizacije je potrebno vzorce BAL-a ustrezno obdelati oz. pripraviti. Določitev limfocitnih podvrst v BAL-u izvajamo samo v BAL-ih, kjer je v vzorcu zadostno število limfocitov (> 15 % vseh celic). V diagnostične namene, kot pomoč pri postavitvi diagnoze, izvajamo v laboratoriju določitev osnovnih limfocitnih podvrst s pomočjo določanja različnih površinskih celičnih markerjev: limfociti T (CD3+), limfociti B (CD19+), limfociti T CD4 (celice T pomagalk, CD3+CD4+), limfociti T CD8 (celice T zaviralke, CD3+CD8+), celice NK (celice naravne ubijalke, CD3-CD16/56+), celice NKT (celice T naravne ubijalke, CD3+CD16/56+), pri čemer je zelo pomembno tudi razmerje med limfociti T CD4 in limfociti T CD8 (CD4/CD8). Imunofenotipizacijo v BAL-u izvajamo vse od leta 2002. Do aprila 2018 smo za določitev limfocitnih podvrst uporabljali naslednja protitelesa označena z različnimi fluorokromi, ki pri analizi s pretočnim citometrom oddajajo svetlobo specifične valovne dolžine: A) CD45-FITC/CD14-PE, B) IgG1-FITC, IgG2a-PE, C) CD3-FITC/CD19-PE, D) CD3-FITC/CD4-PE, E) CD3-FITC/CD8-PE, F) CD3-FITC/CD16-PE/CD56-PE. Od aprila 2018 določitev limfocitnih podvrst v BAL-u izvajamo z naslednjo kombinacijo označenih protiteles: A) CD3-FITC/CD8-PE/CD45-PerCP/CD4-APC, B) CD3-

FITC/CD16+56-PE/CD45-PerCP/CD19-APC. Imunofenotipizacijo izvajamo s pomočjo pretočnih citometrov FACS Calibur in FACS Canto II in ustrezne programske opreme (SimulSET, FACS Diva, CellQuest Pro). Določitev limfocitnih podvrst z različnimi kombinacijama označenih protiteles ter na različnih pretočnih citometrih daje primerljive rezultate.



Slika 3: Prikaz analize limfocitnih podvrst v BAL-u s pomočjo označenih protiteles: A) CD3-FITC/CD8-PE/CD45-PerCP/CD4-APC in B) CD3-FITC/CD16+56-PE/CD45-PerCP/CD19-APC.

Za preučevanje imunskega stanja in ugotavljanje patogenetskih mehanizmov pri različnih bolezenskih stanjih poleg določanja osnovnih limfocitnih podvrst, izvajamo tudi kompleksnejšo imunofenotipizacijo različnih limfocitnih podvrst v BAL-u in v drugih vzorcih [3-6]. S pomočjo različno označenih protiteles in pretočne citometrije določamo prisotnost in delež celic Th1/Tc1 (CXCR3), Th2/Tc2 (CCR4), Th17/Tc17 (CCR6), regulatornih T-celic (Treg), invariantnih ($V\alpha 24-V\beta 11$) celic NKT; določamo pa tudi markerje aktivacije in zrelosti limfocitov (CD25, CD69, CD27, CD28).

Imunofenotipizacija limfocitnih podvrst v BAL-u je v pomoč pri postavitvi diagnoze pri različnih pljučnih boleznih, poleg tega pa se je določitev različnih limfocitnih podvrst v pljučih in drugih tkivih izkazala kot neprecenljivo orodje za preučevanje mehanizmov oz. imunskega dogajanja. Velika heterogenost celic, ostanki razpadlih celic in prisotnost različnih snovi (ne-pljučnega materiala) dodatno otežuje analizo BAL-a s pretočnim citometrom, zaradi česar je le-ta še zahtevnejša.

Literatura

1. Harbeck RJ. Immunophenotyping of bronchoalveolar lavage lymphocytes. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1998;5(3):271-7.
2. Mortaz E, Gudarzi H, Tabarsi P, M Adcock I, Masjedi MR, Jamaati HR, Garssen J, Velayati AA, A Redegeld F. Flow cytometry applications in the study of immunological lung disorders. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* 2015;14(1):12-8.
3. Korosec P, Osolnik K, Kern I, Silar M, Mohorcic K, Kosnik M. Expansion of pulmonary CD8+CD56+ natural killer T-cells in hypersensitivity pneumonitis. *Chest.* 2007;132(4):1291-7.
4. Rijavec M, Volarevic S, Osolnik K, Kosnik M, Korosec P. Natural killer T cells in pulmonary disorders. *Respir Med.* 2011;105 Suppl 1:S20-5.
5. Korosec P, Rijavec M, Silar M, Kern I, Kosnik M, Osolnik K. Deficiency of pulmonary $V\alpha 24 V\beta 11$ natural killer T cells in corticosteroid-naïve sarcoidosis patients. *Respir Med.* 2010;104(4):571-7.
6. Osolnik K, Rijavec M, Korosec P. Disposal of iNKT cell deficiency and an increase in expression of SLAM signaling factors characterizes sarcoidosis remission: a 4-year longitudinal study. *Respir Res.* 2014;15:91.

KLINIČNA UPORABNOST IMUNOFENOTIPIZACIJE V BRONHOALVEOLARNEM LAVATU (BAL)

Katarina Osolnik, dr. med. Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik

UVOD

BAL je indiciran pri diagnostiki intersticijskih sprememb v pljučih ali zgostitev neznane etiologije. To velja tudi v primerih, ko anamnestični podatki, klinične ugotovitve, radiološki in funkcionalni izvidi govorijo za imunsko, infektivno ali maligno etiologijo sprememb. Pazljiva analiza celičnega profila BAL, skupaj z obširno evaluacijo kliničnih, radioloških in funkcionalnih izvidov, omogoča visoko senzitivnost in specifičnost v diagnostiki posameznih difuznih intersticijskih pljučnih bolezni (DIPB) (1).

V posameznih primerih BAL omogoča postavitev ali izključitev določene diagnoze z nizkim tveganjem napake. Prav v teh primerih je njegova prednost največja, ker omogoča izognitev dodatnim invazivnim posegom npr. kirurški pljučni biopsiji.

V primerih, ko BAL ni diagnostičen, njegov izvid, če ni v skladu s pričakovanji, usmerja pozornost v druge, bolj verjetne diagnoze.

BAL v posameznih primerih omogoča tudi spremljanje aktivnosti bolezni, učinka zdravljenja in ima tudi prognostično vrednost.

Imunofenotipizacija limfocitov v BAL z več kot 15% limfocitov, je v pomoč pri opredeljevanju in spremljanju vnetnega dogajanja v perifernih dihalnih poteh in v pljučnem parenhimu.

Najpomembnejši kazalci, ki kažejo na spremembe v limfocitni homeostazi v pljučih so razmerje med podtipoma limfocitov T, pomagalkami in zaviralkami (CD4/CD8 razmerje), deleži limfocitov T, B in celic NK, nivo aktivacije in apoptoze ter razmerje med celicami Th(c)1 in Th(c)2.

Pretočna citometrija omogoča hitro in hkrati večparametersko analizo velikega števila celic in opredelitev tudi zelo majhnih celičnih populacij.

Delež limfocitov B v BAL je večinoma zelo majhen (<6%). Povečan delež B limfocitov pa kaže na možnost limfoproliferativnega obolenja.

Pretočna citometrija BAL, v sicer redkih primerih ekstramedularnega multiplega mieloma, ki je prizadel tudi pljuča, omogoča identifikacijo za to bolezen značilnih celic (2).

Pri sumu na metastaze v pljučih in difuzno rastočem adenokarcinomu, pljučnem limfomu ali levkemični infiltraciji pljuč, lahko pričakujemo od BAL pomembno korist, vključno s pretočno citometrijo.

TEHNIČNA IZVEDBA BAL

Bronhoalveolarni izpirek (BAL) je varna in neinvazivna metoda odvzemanja vzorcev med bronhoskopijo z upogljivim bronhoskopom, ki jo bolniki večinoma dobro prenašajo.

Za vrednotenje BAL je bistvenega pomena, da je le-te izveden po standardiziranem postopku, ki je znotraj določenega centra, ki se s to preiskavo ukvarja, splošno sprejet in uporabljan.

Glavni cilj BAL je, da z injicirano tekočino dosežemo mesto patološkega procesa, da je izpirek reprezentativen vzorec, ki vsebuje celice in necelične komponente, ki odražajo patofiziološki proces na določenem mestu npr. vnetje. Če je proces difuzen je vzorec z enega mesta reprezentativen za celotna pljuča (kot npr. pri sarkoidozi). Pri boleznih, ki celotnih pljuč ne prizadanejo difuzno, poročajo o razlikah v celičnih in neceličnih komponentah BAL (kot npr. pri idiopatski pljučni fibrozi).

INDIKACIJE ZA BAL

BAL je indiciran pri intersticijskih infiltratih s sumom na: sarkoidozo, ekstrinzični alergijski bronhioloalveolitis, z zdravili povzročeni pnevmonitis, idiopatske intersticijske pljučnice,

sistemske vezivnotkivne bolezni, granulomatozo Langerhansovih celic in karcinomsko limfangiozo.

BAL je lahko diagnostičen pri: granulomatozi Langerhansovih celic (CD1 pozitivne Langerhansove celice), malignih infiltratih (karcinomi, limfomi, levkemije), eozinofilnih pljučnicah (>25% eozinofilcev), alveolarni proteinozi (PAS-pozitivni delci, penasti makrofagi), oportunističnih infekcijah (Pneumocystis carinii, glive, CMV) in lipidni pljučnici. Pomembne informacije od BAL lahko pričakujemo pri: sindromu alveolarne krvavitve, azbestni ekspoziciji, sarkoidozi in ekstrinzičnem alergijskem alveolitisu.

Tudi normalen BAL, čeprav ni diagnostičen, lahko služi za izključitev posameznih diagnoz: EABA, eozinofilna pljučnica, alveolarna hemoragija.

Kje je mesto BAL v diagnostiki DIPB?

- 1) izčrpna anamneza s poudarkom na izpostavljenosti vplivom okolja na delovnem mestu in doma
- 2) natančen klinični pregled, s posebnim poudarkom na ugotovitvi ali je bolezen večorganska (kožne spremembe, sklepne bolečine, vnetja oči...)
- 3) izmera pljučne funkcije in po potrebi analiza plinov v arterijski krvi
- 4) rentgenogram prsnih organov in visokoločljivostni CT
- 5) usmerjeno izbrane serološke preiskave (npr. ANCA, ANA, ACE, precipitini...)
- 6) **BAL**
- 7) bronhoskopska pljučna biopsija
- 8) kirurška pljučna biopsija

SARKOIDOZA

Sarkoidoza je granulomatoza za katero je značilna limfocitoza v BAI. Značilna je prevlada CD4 limfocitov. Indeks CD4/CD8 večji od 5 ima 54% senzitivnost in 92% specifičnost (3,4). Ob nizki senzitivnosti povečanega CD4/CD8 indeksa tudi normalen ali zmanjšan indeks ne izključuje sarkoidoze. Za postavitev diagnoze je potrebna histološka potrditev.

Ob pregledu 361 BAI bolnikov z na novo odkrito sarkoidozo ugotavljamo limfocitozo v BAI (povprečje 29,7%) z zvišanim indeksom CD4/CD8 (povprečje 6,12).

Primerjava BAI iz dveh različnih mest ni pokazala statistično pomembnih razlik.

Pri bolnikih s sarkoidozo smo študijsko spremljali podvrste limfocitov v BAL in krvi:

v prospektivni študiji novoodkritih bolnikov s sarkoidozo smo ugotovili pomembno deficienco iNKT celic v krvi in BAL in zmanjšano ekspresijo SLAM signalnih faktorjev pri bolnikih z novo odkrito sarkoidozo. Tekom 4 letnega spremljanja smo ugotavljali pomemben porast iNKT celic v krvi in ekspresije SLAM signalnih faktorjev (SLAMF1, SLAMF6, in FYN). Ta porast jasno korelira z izboljšanjem klinične slike. Po 4 letih smo ugotavljali remisijo bolezni pri večini bolnikov, ki jo je spremljalo tudi izginotje iNKT deficiencie.

Po 4 letih je nivo iNKT celic bolnikov v remisiji dosegel nivo kontrolne skupine.

Longitudinalna študija je pokazala upad deficiencie invariantnih NKT celic v krvi vzporedno s porastom ekspresije SLAM signalnih faktorjev pri bolnikih, ki so dosegli remisijo pljučne sarkoidoze. (5)

EKSTRINZIČNI ALERGIJSKI BRONHIOLO ALVEOLITIS (EABA)

Za EABA je značilna najintenzivnejša limfocitoza v BAL med vsemi intersticijskimi pljučnimi boleznimi (6). Običajno ugotavljamo relativno prevlado limfocitov CD 8 ob sicer tudi absolutno večjem številu CD 4 limfocitov. Za akutne epizode EABA je značilna prisotnost nevtrofilnih granulocitov, pomembno vlogo ima tudi TNF- α . Pri 77 opravljenih BAI pri bolnikih z EABA ugotavljamo limfocitozo (povprečje 28,6 % limfocitov), kar je v

primerjavi z limfocitozo pri bolnikih s sarkoidozo nižja vrednost, in znižan indeks CD4/CD8 (povprečje 1,09). Ob primerjavi BAI iz dveh različnih mest pri bolnikih z EABA nismo našli statistično pomembnih razlik.

ZAKLJUČEK

K diagnostiki DIPB moramo vedno pristopati stopenjsko, na vsaki stopnji upoštevati, da je klinična ocena glavni del diagnostičnega postopka. Posamezne laboratorijske ugotovitve, vključno s pretočno citometrijo, so le kamenčki v mozaiku, ki ga v teku diagnostike sestavljamo.

BAL je tehnika, ki je omogočila potrditev domneve, da je za DIPB značilno vnetje alveolarnih struktur-alveolitis. Iz analize celic BAL, ki ji v primeru limfocitoze (>15% limfocitov) (7) sledi imunofenotipizacija, lahko sklepamo na vrsto in intenzivnost vnetja. S kliničnega stališča lahko BAL pri DIPB igra vlogo v diagnostiki, oceni napredovalosti bolezni in oceni učinka zdravljenja oziroma napredovanja bolezni le pri posameznih entitetah: sarkoidozi, ekstrinzičnem alergijskem alveolitisu, prizadetosti pljuč pri limfoproliferativnih obolenjih. Prav pri slednjih s kliničnega stališča težke diagnostike ob sumu na prizadetost pljuč lahko pričakujemo verjetno še dodaten napredek tudi ob pomoči pretočne citometrije (8).

Literatura

- 1) Kern I, Eržen D, Kecelj P, Košnik M, Mermolja M. Citologija bronhoalveolarnega izpirka pri intersticijskih pljučnih boleznih. *Zdrav Vestn* 2003; 72(4): 217-21.
- 2) Lok R. et al: Multiple myeloma causing interstitial pulmonary infiltrates and soft-tissue plasmacytoma: *Respiratory Medicine Case Reports* 24 (2018) 155–157.
- 3) Costabel U, Zaiss A W, Guzman J: Sensitivity and specificity of BAL findings in sarcoidosis. *Sarcoidosis* 1992, 9 (Suppl1):211-214.
- 4) Thomeer M, Demedts M: Predictive value of CD4/CD8 ratio in BAL in the diagnosis of sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 1997, 14 (Suppl1):36.
- 5) Osolnik et al. Disposal of iNKT cell deficiency and an increase in expression of SLAM signaling factors characterizes sarcoidosis remission: a 4-year longitudinal study *Respiratory Research* 2014, 15:91.
- 6) Costabel U, Guzman J: Bronchoalveolar lavage in interstitial lung disease. *Curr Opin Pulm Med* 2001, 7:255-261.
- 7) Meyer KC, Raghu G, Baughman RP, Brown KK, Costabel U, du Bois RM, et al. An official American Thoracic Society clinical practice guideline: the clinical utility of bronchoalveolar lavage cellular analysis in interstitial lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;185:1004–14.
- 8) Yu, Hotten, Malakhau, et al.: Flow Cytometry in Human BAL and Lung Tissue: *Am J Respir Cell Mol Biol* Vol 54, Iss 1, pp 13–24, Jan 2016.

IMUNOFENOTIPIZACIJA PLJUČNIH TKIVNIH LIMFOCITOV PRI BOLNIKI S TERMINALNIM KOPB

Assist. mag. Irena Šarc, dr. med., prof. Peter Korošec, univ. dipl. biol. Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik

UVOD

Vloga pridobljenega imunskega sistema v širšem smislu in limfocitov T ožjem smislu v patogenezi kronične obstruktivne pljučne bolezni (KOPB) in idiopatske pljučne fibroze (IPF) je še vedno nepojasnjena. Pri obeh boleznih je vzročni dejavnik bolezni cigaretni dim. Večina raziskav imunofenotipizacije limfocitov je bilo opravljenih iz vzorcev periferne krvi in dihalnih poti oz. inducirane sputuma. Raziskave, ki bi primerjale tkivne limfocite v pljučnem tkivu bolnikov in zdravih posameznikov so zaradi tehnične zahtevnosti zelo redke.

Več raziskav je pokazalo povečano število CD8⁺ limfocitov v osrednjih in perifernih dihalnih poteh z obratno sorazmerno povezavo s stopnjo obstrukcije, kar sugerira vlogo limfocitov CD8⁺ v patogenezi KOPB. Z našimi lastnimi raziskavami v preteklosti nismo dokazali bistvenih razlik med različnimi spirometričnimi stopnjami KOPB v deležih subpopulacij limfocitov T; razlik nismo našli niti v njihovem izražanju aktivacijskih ali diferenciacijskih markerjev.

Kajenje samo povzroča lokalno vnetje v pljuči in vpliva na distribucijo subpopulacij limfocitov T v BAL-u bolnikov z blago in zmerno KOPB; povišan je delež CD8⁺ limfocitov, ki je bolj kot od stopnje obstrukcije odvisen od aktivnega kajenja. Kadilci imajo podobno kot bolniki s KOPB povišan delež CD8⁺ limfocitov v primerjavi z nekadilci. Prepričljivih dokazov, da limfociti CD8⁺, ki se v stabilni bolezni nahajajo v pljučnem tkivu, prispevajo k patologiji KOPB, zaenkrat ni, saj je veliko prekrivanja značilnosti limfocitov CD8⁺ v pljuči bolnikov s KOPB in kadilcev, ki nimajo KOPB.

Raziskave kažejo tudi povišan delež CD4⁺ limfocitov in prevlado Th1 polariziranih limfocitov v perifernih dihalnih poteh in krvi bolnikov s KOPB.

Na živalskih modelih emfizema so raziskave dale nasprotujoče rezultate glede vloge limfocitov T v patogenezi nastanka emfizema. Nekatere raziskave so ugotovile, da so limfociti T CD8⁺ nujno potrebni za razvoj emfizema, spet druge pa so ugotovljale, da se je emfizem razvil tudi na mišjem modelu v odsotnosti pridobljenega imunskega sistema.

Namen naše raziskave je bil določiti subpopulacije tkivnih pljučnih limfocitov T v pljuči bolnikov z napredovalo KOPB in jih primerjati z IPF in pljuči zdravih oseb.

METODE

Pljučno tkivo smo pridobili pri bolnikih, pri katerih je bila opravljena presaditev pljuč zaradi napredovale KOPB in IPF v bolnišnici AKH na Dunaju, kontrolno zdravo pljučno tkivo smo pridobili od zdravih donorjev pljuč. Analizirali smo tkivo, pridobljeno od 9 bolnikov s KOPB in pri 9 bolnikov z IPF ter 7 donorjev pljuč. Tkivne limfocite smo analizirali s pretočnim citometrom za izražanje markerjev Th1, Th2, Th17, Treg ter markerjev aktivacije in diferenciacijskih markerjev CD8⁺ celic ter označevalcev invariantnih naravnih celic ubijalk. Izražanje transkripcijskih faktorjev subpopulacij CD4⁺ limfocitov smo analizirali s kvantitativnim PCR.

REZULTATI

Najbolj pomembna ugotovitev naše raziskave je več kot 20-kratna razlika v deležu limfocitov Th1 v pljučnem tkivu KOPB in IPF v primerjavi s pljučnim tkivom zdravih kontrol (mediana 6,8% (IQR 2,7-15,5) in 6,9% (4,2-10,2) v primerjavi z 0,28% (0,12-1,06) limfocitov, $p < 0,001$). Pretočne citometrične razlike pri Th1 smo potrdili z razlikami v izražanju transkripcijskega faktorja TBET1. Poleg tega so bili pri bolnikih s KOPB in IPF pomnoženi

CD8+ limfociti v primerjavi s kontrolami ($p = 0,042$); CD8+ limfociti so bili skoraj izključno diferencirani citotoksični fenotip CD27-CD28- (več kot 98,7%). Delež tega fenotipa CD8+ limfocitov je bil signifikantno povečan pri KOPB in IPF (mediana 12,6% (8,9-22,6) in 15,2% (9,6-27,6) v primerjavi z 2,3% (1,0-10,8) limfocitov, $p = 0,013$). V izražanju aktivacijskih označevalcev med skupinami nismo ugotovili nobene razlike, prav tako ni bilo med skupinami razlik v deležu invariantnih naravnih celic ubijalk.

ZAKLJUČKI

Imunofenotipizacija pljučnih tkivnih limfocitov pri bolnikih z napredovalim KOPB kaže zelo podobne vzorce vnetja pridobljenega imunskega odziva kot pri napredovali IPF, ki vključuje predvsem Th1 limfocite in CD8+ limfocite z največjim citotoksičnim potencialom. To je prva raziskava, ki direktno primerja subpopulacije pljučnih tkivnih limfocitov KOPB in IPF z zdravim pljučnim tkivom. Kakšen je pomen podobnosti med napredovalo KOPB in IPF bo predmet bodočih raziskav.

REFERENCE

1. O'Shaughnessy TC , Ansari TW , Barnes NC , Jeffery PK. Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8 1 T lymphocytes with FEV1 . *Am J Respir Crit Care Med* . 1997;155(3): 852 - 857 .
2. Forsslund H, Mikko M, Karimi R, Grunewald J, Wheelock ÅM, Wahlström J, Sköld CM. Distribution of T-cell subsets in BAL fluid of patients with mild to moderate COPD depends on current smoking status and not airway obstruction. *Chest*. 2014;145:711-722.
3. Marc MM, Korosec P, Kern I, Sok M, Ihan A, Kosnik M. Lung tissue and tumour-infiltrating T lymphocytes in patients with non-small cell lung carcinoma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD): moderate/severe versus mild stage of COPD. *Scand J Immunol*. 2007;66:694-702.
4. Saetta M , Baraldo S , Corbino L , et al . CD8 1 ve cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease . *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160: 711 – 7.
5. Sullivan AK, Simonian PL, Falta MT, Mitchell JD, Cosgrove GP, Brown KK, Kotzin BL, Voelkel NF, Fontenot AP. Oligoclonal CD4+ T cells in the lungs of patients with severe emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172(5):590-6.

Imunofenotipizacija tkivnih limfocitov pri bolnikih s polipoznim in nepolipoznim kroničnim rinosinuzitisom

as.mag. Tanja Soklič Košak 1, Mira Šilar 2, doc. dr. Matija Rijavec 2, dr. Ana Koren 2, prim. Izidor Kern 2, prof.dr. Irena Hočevnar Boltežar 1, prof.dr. Peter Korošec 2

1 Klinika za ORL in CFK, UKC Ljubljana

2 Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik

1. UVOD

Kronični rinosinuzitis (*Chronic rhinosinusitis*, CRS) je kronično vnetje sluznice nosu in obnosnih votlin, ki traja več kot 12 tednov z občasnimi poslabšanji. Prevalenco CRS v evropski odrasli populaciji ocenjujejo na 10,9%¹. CRS razdelimo na kronični rinosinuzitis z nosnimi polipi (*Chronic rhinosinusitis with nasal polyps*, CRSwNP) z obojestranskimi polipi v srednjih nosnih hodnikih in kronični rinosinuzitis brez nosnih polipov (*Chronic rhinosinusitis without nasal polyps*, CRSsNP) z obojestransko prisotnim edemom sluznice ali izcedkom v srednjih nosnih hodnikih in / ali z zadebeljeno sluznico obnosnih votlin na računalniško tomografskih (CT) slikah². Kar do 20% bolnikov ima kljub ustreznemu medikamentoznemu in kirurškemu zdravljenju težko obvladljiv CRS s pogostimi akutnimi poslabšanji in stalnimi motečimi simptomi, ki jih opredelijo na vizualni analogni lestvici (VAS) kot 5 ali več³. V naši raziskavi smo želeli ugotoviti razlike v podtipih tkivnih T limfocitov med CRSwNP in CRSsNP ter identificirati podtip T limfocitov, odgovoren za težko obvladljiv CRS.

2. METODE

Vključili smo 33 novodiagnosticiranih bolnikov z anamnezo dolgoletnih simptomov CRS (19 CRSwNP in 14 CRSsNP), ki še niso bili zdravljeni in niso še nikoli prejeli nosnih ali sistemskih kortikosteroidov. Diagnozo smo postavili na podlagi simptomov, endoskopije nosu in CT obnosnih votlin. Po podpisu informiranega soglasja smo ob prvem pregledu odvzeli biopsijo sluznice iz srednjega nosnega hodnika (košček polipa ali sluznico s *processus uncinatus*). Histopatološka analiza je zajemala število tkivnih eozinofilcev v polju visoke povečave (*high power field*, HPF), nevtrofilno infiltracijo, debelino bazalne membrane, podsluznični edem, hiperplastične in papilarne spremembe, ploščatocelično metaplazijo ter fibrozo). Pri 31 bolnikih (18 CRSwNP, 13 CRSsNP) smo s pretočno citometrijo analizirali vezavo vrstno-specifičnih protiteles (CD3, CD4, CD8, CCR4, CCR6, CXCR3) in protiteles za membranske markerje aktivacije (CD28, CD27, CD25, CD69, HLA-DR). Bolnike smo nato zdravili medikamentozno in v primeru vztrajanja simptomov ter znakov tudi kirurško (z endoskopsko operacijo sinusov). Povprečno smo bolnike redno spremljali 24 do 36 mesecev od biopsije. Bolniki s perzistentnimi simptomi na VAS ≥ 5 in endoskopskimi znaki so bili uvrščeni v skupini težko obvladljivega CRSwNP ali CRSsNP, ostali pa v skupini urejenega CRSwNP ali CRSsNP. Podatke smo obdelali in analizirali s statističnim programom GraphPad Prism 6.0. Raziskavo je odobrila Komisija RS za medicinsko etiko.

3. REZULTATI IN RAZPRAVA

Bolniki v CRSwNP in CRSsNP skupini so bili primerljivi po starosti, spolu, kajenju, alergiji, astmi, KOPB, trajanju simptomov CRS in oceni simptomov na VAS. Kot smo pričakovali, so bolniki s CRSwNP imeli signifikantno več endoskopskih znakov in CT znakov. Tkivna eozinofilija >10 / HPF je bila značilno pogostejša pri CRSwNP (68%) kot pri CRSsNP (14%), prav tako je bil pri CRSwNP pogostejši zmeren do hud podsluznični edem; obe histopatološki razliki so ugotavljali tudi v drugih raziskavah². V ostalih histopatoloških lastnostih (nevtrofilna infiltracija, debelina bazalne membrane, podsluznični edem,

hiperplastične in papilarne spremembe, ploščatocelična metaplazija in fibroza) se skupini CRSwNP in CRSsNP nista razlikovali.

Pri CRSwNP smo našli več CD4+ T limfocitov (slika 1A) in več aktiviranih CD4+CD25+ celic (slika 1C), kar kaže na Th-posredovano vnetje, ugotovljeno tudi v predhodnih raziskavah^{4,5}. Pri CRSwNP je bilo več Th1 celic kot pri CRSsNP (slika 1B), skupini pa se nista razlikovali v številu Th2 in Th17 celic (slika 1B). Pri CRSsNP je bilo v sluznici višje število CD8+ in efektorско-citotoksičnih CD8+CD28-CD27- celic, hkrati pa nižje število centralnih spominskih CD8+CD28+CD27+ celic (sliki 1A in 1D), kar so znaki prevladujočega citotoksičnega vnetja. V obeh skupinah je nosna sluznica vsebovala presenetljivo visok delež (10-20%) dvojno negativnih (DN) T celic CD4-CD8- (slika 1A), ki običajno v tkivu dosega le 1-5%⁶. Glede na naše podatke smo prvič prikazali tako visoko število DN T celic v CRS sluznici, poleg tega smo prikazali višji delež efektorско-citotoksičnih (CD28-CD27-) DN T celic in le nižji delež centralno spominskih (CD28+CD27+) DN T celic (slika 2D).

Težko obvladljivi CRS je bil prisoten pri 5 od 18 bolnikov s CRSwNP in pri 5 od 13 bolnikov s CRSsNP. Pri težko obvladljivem CRSwNP smo v nosni sluznici našli 3-krat višje število vnetnih DN T celic kot pri urejenem CRSwNP (slika 2A). Primerljivi rezultati so opisani pri bolnikih s Sjögrenovim sindromom in sistemskim lupus eritematosusom, pri katerih so bile DN T celice zvišane in rezistentne na kortikosteroide⁷. Trenutno še ni znan izvor DN T celic; novejša raziskava poročajo, da bi lahko nastale iz CD8+ celic preko epigenetskega remodeliranja CD8 ko-receptorjev⁸. DN T celice bi lahko izločale velike količine vnetnega mediatorja IL-5, ki posreduje vnetje tipa 2^{6,9}. V številu Th1 in Th2 celic nismo našli razlik med urejenim in težko obvladljivim CRSwNP (slika 2B). Pri urejenem CRSwNP smo našli več Th17 celic (slika 2B), kar je skladno z nedavnimi ugotovitvami, da so Th17 celice del normalnega homeostatskega imunskega odgovora v zdravi nosni sluznici⁵. Pri težko obvladljivem CRSwNP je bil med sluzničnimi CD8+ in DN T celicami prisoten nižji delež delno diferenciranih, efektorско-spominskih CD28-CD27+ celic kot pri urejenem CRSwNP (sliki 2C in 2D).

Pri težko obvladljivem CRSsNP smo opazovali več CD8+ citotoksičnih celic in manj DN T celic kot pri urejenem CRSsNP (slika 2E), kar kaže, da bi bile lahko CD8+ glavne patogene celice pri CRSsNP. Fenotipsko in endotipsko je CRSsNP zelo heterogena bolezen, vrnitev simptomov po zdravljenju je pogosta, zdravljenje pa še posebej težko odpravi glavobol². Potrebne bodo še dodatne raziskave CD8+ celic in efektorско-citotoksičnih CD8+ CD28-CD27- celic pri CRSsNP, da bi bolje razumeli patogenezo in zdravljenje.

Naša raziskava ima tudi nekaj pomanjkljivosti. Vključenih je bilo relativno nizko število bolnikov, vendar so bili izbrani le bolniki z dolgoletnimi, težkimi simptomi CRS, ki do vključitve še nikoli niso prejeli nosnih ali sistemskih kortikosteroidov. Nismo analizirali potencialno pomembnih tkivnih γδ T celic. Zanimivo je, da smo našli značilno več DN T celic pri težko obvladljivem CRSwNP, a manj pri težko obvladljivem CRSsNP. Vloga teh celic v CRS sluznici ni znana; predhodne raziskave na tkivih bolnikov z drugimi kroničnimi vnetji kažejo, da so lahko močno efektorске in izločajo citokine^{7,10}, lahko pa so supresorske in zavirajo škodljivo citotoksično delovanje CD8+ celic ter z njimi povezane poškodbe tkiva⁶. Našli smo višje število Th1 celic pri CRSwNP, a niso vplivale na kontrolo bolezni; podobno so v pretočno-citometrični raziskavi pri CRSwNP poleg prisotnosti Th2 celic našli prevladujoče celice, ki v bazalnih pogojih niso izločale citokinov in so jim avtorji pripisali omejen patogenetski potencial v CRSwNP⁴.

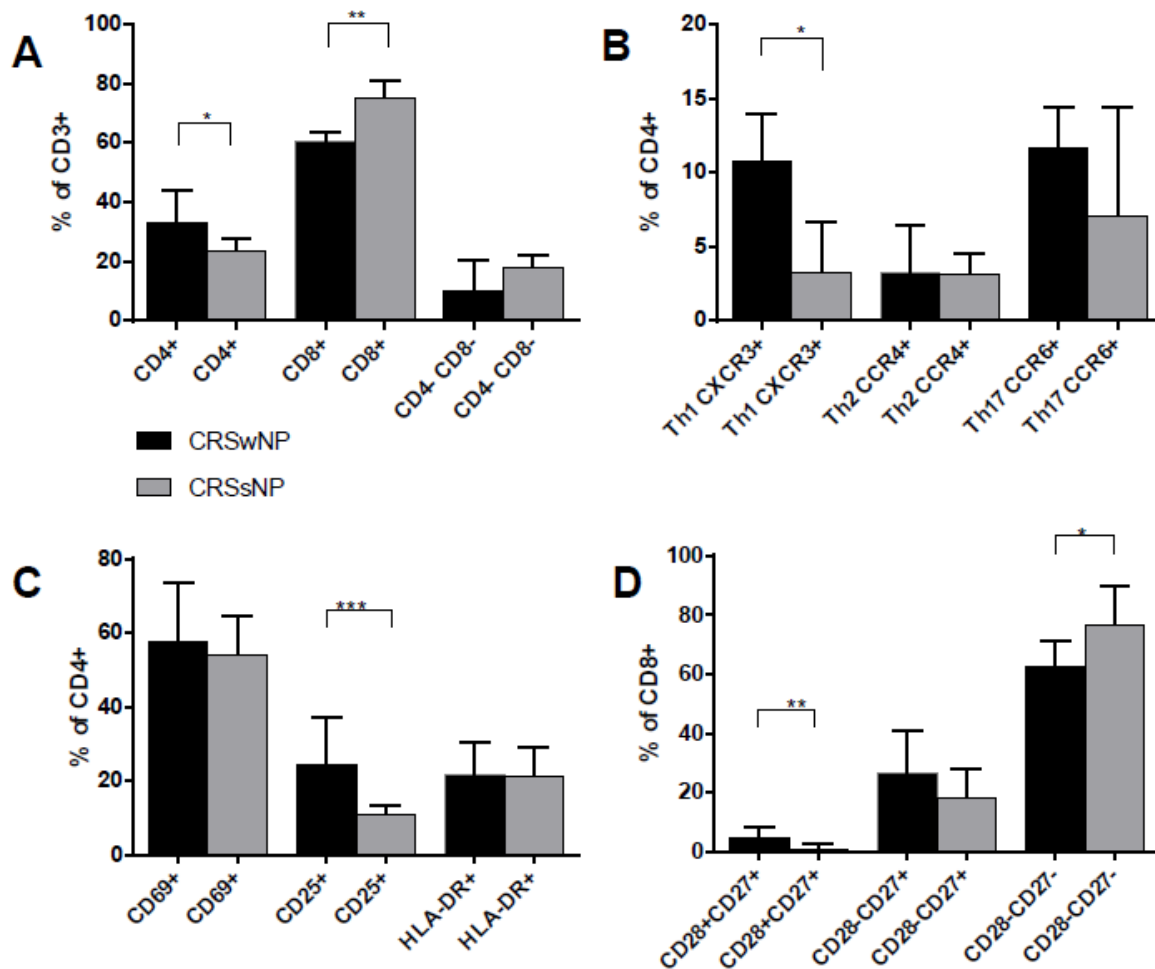
4. ZAKLJUČEK

Ugotovili smo razliko v podtipih T celic med CRSwNP in CRSsNP: več CD4+ pri CRSwNP ter več CD8+ z višjim efektorско-citotoksičnim CD8+CD28-CD27- deležem pri CRSsNP. Prvič smo prikazali zvišano število DN T celic pri CRS. Prav tako je bila to prva raziskava, ki

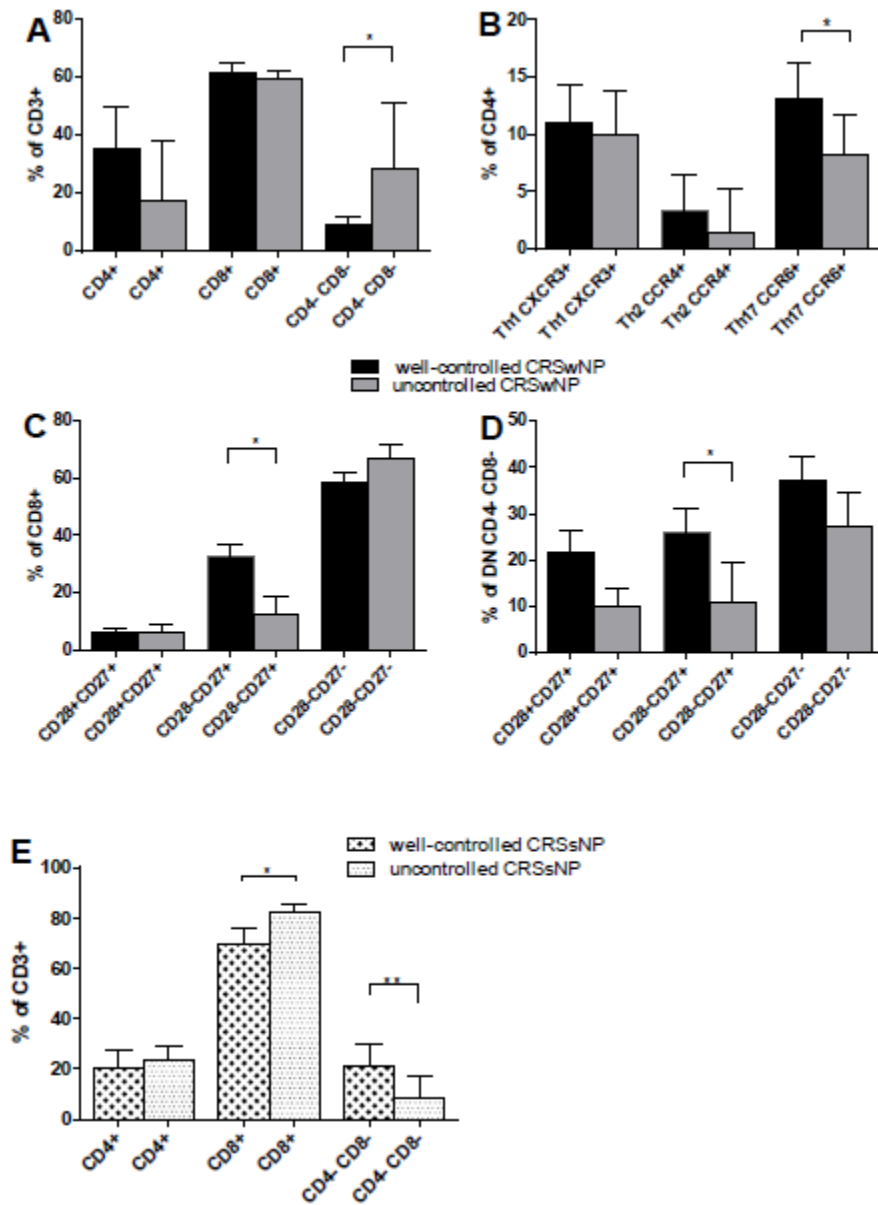
je analizirala podtipe T celic glede na kontrolo CRS bolezni. Pri težko obvladljivem CRSwNP smo našli višji delež vnetnih efektorskih DN T celic. Naši rezultati kažejo, da DN T celice igrajo pomembno vlogo v patofiziologiji težko obvladljivega CRSwNP in bi lahko predstavljale novo tarčo za zdravljenje.

5. LITERATURA

1. Hastan D, Fokkens WJ, Bachert C, Newson RB, Bislimovska J, Bockelbrink A, et al. Chronic rhinosinusitis in Europe--an underestimated disease. A GA²LEN study. *Allergy*. 2011;66:1216–23.
2. Akdis CA, Bachert C, Cingi C, Dykewicz MS, Hellings PW, Naclerio RM, et al. Endotypes and phenotypes of chronic rhinosinusitis: A PRACTALL document of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology and the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131:1479–90.
3. Hellings PW, Fokkens WJ, Akdis C, Bachert C, Cingi C, Dietz de Loos D, et al. Uncontrolled allergic rhinitis and chronic rhinosinusitis: where do we stand today? *Allergy*. 2013;68:1–7.
4. Derycke L, Eyerich S, Van Crombruggen K, Perez-Novo C, Holtappels G, Deruyck N, et al. Mixed T Helper Cell Signatures In Chronic Rhinosinusitis with and without Polyps. Zhang L, editor. *PLoS One*. 2014;9:e97581.
5. Lam EPS, Kariyawasam HH, Rana BMJ, Durham SR, McKenzie ANJ, Powell N, et al. IL-25/IL-33-responsive T H 2 cells characterize nasal polyps with a default T H 17 signature in nasal mucosa. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137:1514–24.
6. Fischer K, Voelkl S, Heymann J, Przybylski GK, Mondal K, Laumer M, et al. Isolation and characterization of human antigen-specific TCRab+CD4- CD8- double-negative regulatory T cells. *Blood*. 2005;105:2828–36.
7. Alunno A, Bistoni O, Bartoloni E, Caterbi S, Bigerna B, Tabarrini A, et al. IL-17-producing CD4 – CD8 – T cells are expanded in the peripheral blood, infiltrate salivary glands and are resistant to corticosteroids in patients with primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2013;72:286–92.
8. Renauer PA, Coit P, Sawalha AH. The DNA methylation signature of human TCR⁺CD4⁺CD8⁻ double negative T cells reveals CG demethylation and a unique epigenetic architecture permissive to a broad stimulatory immune response. *Clin Immunol*. 2015;156:19–27.
9. Crispin JC, Tsokos GC. Human TCR- + CD4- CD8- T Cells Can Derive from CD8+ T Cells and Display an Inflammatory Effector Phenotype. *J Immunol*. 2009;183:4675–81.
10. Hedrich CM, Crispín JC, Rauen T, Ioannidis C, Koga T, Rodriguez Rodriguez N, et al. cAMP Responsive Element Modulator (CREM) α Mediates Chromatin Remodeling of CD8 during the Generation of CD3 + CD4 – CD8 – T Cells. *J Biol Chem*. 2014;289:2361–70.



Slika 1: Različni sluznični podtipi T celic pri kroničnem rinosinuzitisu z nosnimi polipi (CRSwNP) in brez nosnih polipov (CRSsNP). **(A)** CD4+, CD8+ in dvojno negativne (DN) T celice. **(B)** Th1 CXCR3+, Th2 CCR4+ in Th17 CCR6+ celice. **(C)** Ekspresija markerjev aktivacije CD69+, CD25+ in HLA-DR+ na CD4+ celicah. **(D)** Centralne spominske CD8+CD28+CD27+, spominsko efektorske CD8+CD28-CD27+ in efektorsko citotoksične CD8+CD28-CD27- celice. * P<0.05, ** P<0.001, in *** P<0.0001 pri Mann–Whitney testu.



Slika 2. (A), (B), (C) in (D): Primerjava urejenega in težko obvladljivega CRSwNP. **(A)** CD4+, CD8+ in DN T celice. **(B)** Th1 CXCR3+, Th2 CCR4+ in Th17 CCR6+ celice. **(C)** Centralno spominske CD8+ CD28+CD27+, spominsko efektorske CD8+CD28-CD27+ in efektorsko citotoksične CD8+CD28-CD27- celice. **(D)** Centralno spominske CD4-CD8-CD28+CD27+, spominsko efektorske CD4-CD8-CD28-CD27+ in efektorsko citotoksične CD4-CD8-CD28-CD27- celice. **(E)** Primerjava urejenega in težko obvladljivega CRSsNP v številu CD4+, CD8+ in DN T celic. * P<0.05, ** P<0.001, in *** P<0.0001 pri Mann-Whitney testu.

Vpliv imunoloških in psiholoških dejavnikov na oceno teže alergijskega rinitisa povzročenelega s pelodom trav

Katarina Barbara Bajec¹, Maja Cvelbar¹, Julij Šelb², Anja Simonič², Nuša Zidarn, Mira Šilar², Ana Koren², Peter Korošec², doc. Mihaela Zidarn^{1,2}, dr. med. 1. Medicinska fakulteta Ljubljana; 2 Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik

Uvod

Alergijski rinitis (AR) je alergijska bolezen, ki pomembno vpliva na kakovost življenja. Težo AR posledično ocenjujemo glede na vpliv na kakovost življenja. Ocena teže AR je pomembna za izbiro in oceno uspešnosti zdravljenja. Težo AR ocenimo s pomočjo anamneze in vprašalnikov. Imunološki kazalniki nimajo dobre korelacije s težo bolezni. Predvidevamo, da na oceno teže AR z vprašalniki lahko vplivajo tudi psihološki dejavniki. V dosedanjih študijah je bila že potrjena korelacijo med oceno teže AR in hipohondriazo. Dokazana je bila tudi večja izraženost simptomov AR pri pacientih s slabšim splošnim duševnim stanjem in z negativnimi afektivnimi stanji (nevroticizem, depresija, anksioznost). V literaturi zaenkrat ni podatkov o tem kateri psihološki dejavniki imajo največji vpliv na izraženo težo AR. Z raziskavo smo želeli ugotoviti kateri od imunoloških kazalcev (premer odziva pri kožnih vbodnih testih, titrirani kožni testi, specifična protitelesa IgE, test aktivacije bazofilcev-BAT) najbolje korelira s težo bolezni ter ugotoviti, ali kateri psihološki dejavnik(i) pomembno vpliva(jo) na oceno teže AR.

Metode

Študija je potekala v Pnevmoško-alergološki ambulanti Klinike Golnik v Ljubljani. Bolniki, ki so imeli pozitiven standardni kožni vbodni test za pelod trav, brezo ali lesko in negativen test za celoletne alergene, so ob prvem obisku izpolnili vprašalnike za oceno teže AR in 5 vprašalnikov, s katerimi smo ocenjevali različne psihološke značilnosti. Izvedli smo titriran kožni test, odvzeli serum za določitev sIgE in kri za BAT-test. V času cvetenja trav so bolniki tedensko izpolnjevali skrajšan vprašalnik o kakovosti življenja, po končani sezoni pa so izpolnili vprašalnik za oceno jakosti simptomov ter porabo zdravil v celotni sezoni cvetenja trav.

Rezultati

Rezultati so pokazali, da ni statistično pomembne korelacije med parametri ocene teže AR in imunološkimi parametri (tako med standardnimi imunološkimi testi, kot so velikost odziva pri kožnih vbodnih testih, titrirani kožni testi, sIgE, kot tudi med novjšimi imunološkimi testi – BAT-test). Vidna pa je bila statistično pomembna korelacija med psihološkimi dejavniki (pozornost na privatne vidike telesa, nevroticizem, opazovanje, delno tudi pri prepoznavanju in razumevanju čustev ter mejno pri dejavniku socialno blagostanje) in oceno teže AR.

Zaključek

Na podlagi rezultatov smo ugotovili, da je subjektivno zaznavanje teže AR močno povezano z določenimi psihološkimi značilnostmi, ne pa z rezultati imunoloških testov. Ljudje, ki so občutljivejši na stanje in spremembe v svojem telesu, bodo z večjo verjetnostjo doživljali večje težave zaradi alergijske bolezni. Podobno velja za ljudi z bolj izraženim nevroticizmom ter delno za ljudi, ki so pozornejši na spremembe v svoji okolici, in mejno za tiste, ki so v trenutnem slabšem splošnem psihičnem stanju. Glede na ugotovljeno bi bilo smotrno dosedanjim vprašalnikom za ocenjevanje vpliva AR na življenje pacientov, ki se v klinični praksi že uporabljajo, dodati še oceno posameznih osebnostnih in psiholoških parametrov. Tako bi namreč z večjo verjetnostjo napovedali ter ocenili pričakovano težo alergijske bolezni ter ustrezneje prilagodili zdravljenje.