

# ВЕСЦІ

## НАЦЫЯНАЛЬНАЯ АКАДЭМІЯ НАВУК БЕЛАРУСІ

СЕРЫЯ МЕДЫЦЫНСКІХ НАВУК 2014 № 4

# ИЗВЕСТИЯ

## НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

СЕРИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК 2014 № 4

ЗАСНАВАЛЬНІК – НАЦЫЯНАЛЬНАЯ АКАДЭМІЯ НАВУК БЕЛАРУСІ

Часопіс выдаецца са студзеня 2004 г.

Выходзіць чатыры разы ў год

ЗМЕСТ

### КЛІНІЧНАЯ І ЭКСПЕРЫМЕНТАЛЬНАЯ МЕДЫЦЫНА

Курак Т. А., Митьковская Н. П., Авдей Л. Л., Ильина Т. В., Шкребнева Э. И., Кот Ж. Н., Петрова Е. Б. Атеросклероз у пациентов с ревматоидным артритом: роль окисленных липопротеинов низкой плотности .....	4
Михайлов А. Н., Юрковский А. М., Ачинович С. Л. Сонографические и гистологические сопоставления в оценке выраженности дистрофических изменений задней длинной крестцово-подвздошной связки .....	9
Амвросьева Т. В., Хило А. Н., Поклонская Н. В., Дедюля К. Л., Богущ З. Ф. Векторная конструкция pVK-1,2VT для использования в количественной генодиагностике ВК вирусной инфекции .....	14
Жукова Т. В., Смяянович А. Ф., Пашкевич Л. А., Безубик С. Д., Пархач Л. П., Ахремчук А. И., Ширинский А. А., Хмара М. Е. Клинико-морфологические особенности роста и рецидивирования нейроэпителиальных опухолей, контаминированных вирусом простого герпеса .....	20
Гайшун Е. И., Гайшун И. В., Пристром А. М. Влияние частоты сердечных сокращений на упругие свойства артерий: неинвазивные методы количественной оценки .....	26
Лапицкий Д. В., Ряполов А. Н., Ермолкевич Р. Ф., Метельский С. М., Маничев И. А., Щербицкий В. Г., Митьковская Н. П. Функциональное состояние сердечно-сосудистой системы у лиц с хронической обструктивной болезнью легких .....	32
Ниязова С. С., Чакова Н. Н., Комиссарова С. М., Михаленко Е. П., Крупнова Э. В., Чеботарева Н. В. Гендерные особенности распределения полиморфных вариантов генов <i>ADRB1</i> , <i>ADRB2</i> , <i>ACE</i> , <i>AGT</i> , <i>AGTR1</i> , <i>CYP11B2</i> и <i>CMA1</i> у пациентов с гипертрофической кардиомиопатией .....	44

<b>Миронова Г. П., Тихонович О. Г., Пашкевич С. Г.</b> Поведенческие реакции и автономные функции у крыс при изменении функционального состояния дофаминергической системы.....	51
<b>Поклонская Н. В., Амвросьева Т. В., Богуш З. Ф., Дедюля К. Л., Казинец О. Н., Глинская И. Н., Дашкевич А. М., Ключко Н. Л.</b> Молекулярно-эпидемиологический анализ неполиомиелитных энтеровирусов, доминирующих в Беларуси в 2012–2013 гг. ....	58
<b>Городецкая И. В., Евдокимова О. В.</b> Тиреоидный статус и состояние антиоксидантной системы крыс при стрессе .....	65
<b>Калачик О. В., Уголев И. И., Забелло Т. Н., Садовский Д. Н., Оганова Е. Г., Муравский В. А.</b> Оценка функциональных характеристик альбумина методом электронного парамагнитного резонанса у пациентов после трансплантации почки.....	72
<b>Калиновская Е. И., Кондрашова С. Б., Благун Е. В., Павловец Л. В.</b> Состояние перекисного окисления белков плазмы крови крыс при сахарном диабете и артериальной гипертензии .....	78
<b>Пашкевич С. Г., Песоцкая Я. А., Денисов А. А., Рожнова Л. Э., Емельянова А. А.</b> Электрофизиологические и ультраструктурные изменения в СА1 области гиппокампа при моделировании гипоксии <i>in vitro</i> .....	82
<b>Гармаза Ю. М., Зубрицкая Г. П., Кутько А. Г., Патеюк И. В., Митьковская Н. П., Степанова Ю. И., Слобожанина Е. И.</b> Интегральная оценка антиоксидантного статуса и физического состояния мембранных липидов эритроцитов периферической крови пациентов с метаболическим синдромом .....	90
<b>Зиматкин С. М., Бонь Е. И.</b> Гистологические изменения коры мозга 45-суточного потомства крыс после пренатального воздействия этанола .....	97
<b>Бегун И. В., Красько О. В., Зборовская А. А., Алейникова О. В.</b> Особенности развития злокачественных эмбриональных опухолей у детей первого года жизни .....	102

#### АГЛЯДЫ

<b>Исайкина Я. И., Жерносеченко А. А., Алейникова О. В.</b> Потенциал культивированных мезенхимальных стволовых клеток человека для восстановления дефектов хряща .....	109
<b>Романова И. В., Гончаров А. Е., Горбунов В. А.</b> Роль базофилов в аллергических реакциях и цитофлуориметрические методы определения их активации .....	115

---

ИЗВЕСТИЯ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ 2014 № 4

Серия медицинских наук

*на русском, белорусском и английском языках*

Журнал зарегистрирован в Министерстве информации Республики Беларусь,  
свидетельство о регистрации № 393 от 18.05.2009

---

Тэхнічны рэдактар В. А. Т о ў с т а я

Камп'ютарная вёрстка В. М. К а р п о в і ч

Здадзена ў набор 30.10.2014. Падпісана ў друк 13.11.2014. Выхад у свет 25.11.2014. Фармат 60×84<sup>1</sup>/<sub>8</sub>. Папера афсетная.

Друк лічбавы. Ум. друк. арк. 14,88. Ул.-выд. арк. 16,4. Тыраж 68 экз. Заказ 195.

Кошт нумару: індывідуальная падпіска – 58 650 руб., ведамасная падпіска – 141 919 руб.

Выдавец і паліграфічнае выкананне:

Рэспубліканскае ўнітарнае прадпрыемства «Выдавецкі дом «Беларуская навука». Пасведчанне аб дзяржаўнай рэгістрацыі выдаўца, вытворцы, распаўсюджвальніка друкаваных выданняў № 1/18 ад 02.08.2013.

ЛП № 02330/455 ад 30.12.2013. Вул. Ф. Скарыны, 40, 220141, Мінск.

© Выдавецкі дом «Беларуская навука».

Весці НАН Беларусі. Серыя медыцынскіх навук, 2014

УДК 616-056.3+612.112.93:571.27

*И. В. РОМАНОВА, А. Е. ГОНЧАРОВ, В. А. ГОРБУНОВ*

## **РОЛЬ БАЗОФИЛОВ В АЛЛЕРГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЯХ И ЦИТОФЛУОРИМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИХ АКТИВАЦИИ**

*Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь*

*(Поступила в редакцию 01.10.2014)*

**Введение.** На сегодняшний день аллергия, сопровождающаяся различными клиническими проявлениями, является наиболее частым хроническим заболеванием, от которого страдает более 60 млн людей в Европе и около 22 % в мировой популяции [1, 2]. В последние годы отмечается тенденция к улучшению качества оказания медицинской помощи пациентам, страдающим аллергическими заболеваниями. Постоянно разрабатываются и внедряются новые методы терапии и диагностики алергопатологии.

Проблема возникновения аллергических реакций на лекарственные препараты актуальна во всем мире, в том числе и в Республике Беларусь. Лекарственная аллергия – это повышенная специфическая иммунная реакция на лекарственные средства, сопровождающаяся общими и местными клиническими проявлениями. Лекарственную аллергию вызывают, как правило, следующие группы лекарственных средств: антибиотики и сульфаниламиды, нестероидные противовоспалительные препараты (НПВС), поливитамины, инсулины животного происхождения.

Наличие сенсibilизации к тем или иным лекарственным средствам усложняет подбор схем лечения пациентов, сужает перечень доступных для терапии препаратов, сопровождается риском возникновения тяжелых осложнений. Развитие перекрестной сенсibilизации у пациентов с лекарственной аллергией, например, на антибиотики еще больше усложняет задачу терапии в случае наличия жизненных показаний для проведения антибиотикотерапии. Кроме того, следует отметить значительные финансовые затраты, необходимые для лечения лекарственной аллергии, увеличение сроков пребывания пациентов в стационаре и периода временной нетрудоспособности.

**Базофилы и их роль в развитии аллергии.** Базофилы относят к гранулоцитарным лейкоцитам, характеризуются наличием сегментированного ядра и гранул, окрашивающихся основным красителем, например тулоидиновым синим [3]. Содержание циркулирующих базофилов составляет, как правило, менее 1 % от всех лейкоцитов периферической крови. Развитие и созревание базофилов происходит в костном мозге из стволовой гемопоэтической  $lin^-CD34^+Fc\epsilon R1^{hi}c-Kit^-$  клетки. В дифференцировке участвуют ключевые транскрипционные факторы C/EBP $\alpha$  и GATA-2 [4]. Базофилы циркулируют преимущественно в периферической крови, способны мигрировать в лимфатические узлы и селезенку, а также в места воспаления после воздействия аллергена или антигенов гельминтов [5]. Базофильные гранулоциты долгое время считались минорной или «избыточной» субпопуляцией лейкоцитов, родственной с тканевыми тучными клетками. Базофилы действительно обладают сходными характеристиками с тучными клетками, включая наличие гистаминсодержащих гранул, метахроматическое окрашивание, экспрессию высокоаффинного рецептора для IgE, общие транскрипционные факторы [6]. Одним из отличий от базофилов является то, что тучные клетки завершают процесс дифференцировки и созревают только попадая в ткани, где находятся несколько месяцев. На сегодняшний день уникальность функций популяции базофилов очевидна [7].

Базофилы, как правило, вовлечены в реакцию гиперчувствительности первого типа. В основе аллергической реакции лежит аллергическое воспаление, которое начинается с фазы сенсибилизации (индукции) [8]. Первая стадия воспаления включает вовлечение антигенпредставляющих клеток, Т-лимфоцитов, секрецию Th2-специфичных цитокинов, в первую очередь интерлейкин (ИЛ)-4, ИЛ-5 и ИЛ-13. При этом В-лимфоциты осуществляют продукцию специфического IgE, который связывается с высокоаффинным рецептором на поверхности базофилов и тучных клеток, что приводит к формированию первичных эффекторных клеток. Воздействие аллергена на базофилы по механизму IgE-рецептор-опосредованной активации приводит к усилению экспрессии активационных молекул, маркеров дегрануляции и последовательному высвобождению различных провоспалительных медиаторов, включая гистамин, простагландины, а также цитокины ИЛ-4 и ИЛ-13 [9]. Вторая фаза аллергического воспаления – эффекторная. Она начинается с перекрестного связывания причинного аллергена с двумя рядом расположенными IgE на базофилах или тучных клетках, что активирует клетки с последующей дегрануляцией и высвобождением провоспалительных медиаторов или цитокинов (гистамина, LTC<sub>4</sub>, ИЛ-4, ИЛ-13), которые обуславливают клинические проявления аллергии.

Роль базофилов в иммунологических и аллергических реакциях длительное время игнорировалась, поскольку непосредственное изучение их функций было в значительной мере ограничено. Базофилы трудно выделить из периферической крови вследствие низкого их содержания, к тому же присутствует риск активации клеток в процессе манипуляций с кровью. При этом имеется лишь небольшое число подходящих для проведения исследований клеточных линий и моделей животных [10]. На сегодняшний день возможности проточной цитометрии позволяют с легкостью изучать самые немногочисленные популяции клеток периферической крови, оценивать их функцию в норме и при патологии. В 1994 г. Sainte-Laudy [11] впервые показал принципиальную возможность исследования активации базофилов для диагностики гиперчувствительности немедленного типа.

**Методы диагностики аллергии.** В Республике Беларусь в последнее десятилетие налажено определение специфических IgE к пищевым продуктам, пыльце растений, компонентам домашней пыли, ядам насекомых, что позволило во многом решить проблему определения аллергенов, наиболее часто вызывающих развитие реакций гиперчувствительности у пациентов. В то же время существенной проблемой остается диагностика лекарственной аллергии. Золотым стандартом диагностики лекарственной аллергии признан провокационный тест, который в Республике Беларусь выполняется крайне редко ввиду риска системных осложнений [12]. Наиболее часто используются кожные пробы [13], а также реакция дегрануляции тучных клеток и реакция агломерации лейкоцитов, несмотря на то что они характеризуются неприемлемо низкой чувствительностью в отношении большинства лекарственных средств и представляют собой, фактически, лишь исторический интерес. Определение специфических IgE к большинству лекарственных средств затруднено или вообще невозможно в связи с отсутствием соответствующих тест-систем. Так, определение специфического IgE в настоящее время ограничено и возможно только для таких лекарственных средств, как бета-лактамы антибиотики и мышечные релаксанты [14].

В этой связи диагностика аллергии к лекарствам базируется преимущественно на анамнезе заболевания, т. е. ограничивается лишь тем, насколько подробно пациент сможет описать возможные причины аллергической реакции. В последнее время интерес представляют клеточные тесты в качестве *in vitro* диагностики аллергии, в частности тест активации базофилов (ТАБ), который основывается на изучении маркеров активации и/или дегрануляции базофилов в ответ на воздействие причинного аллергена с помощью метода проточной цитометрии [15]. Тест привлекает своей относительной простотой, безопасностью для пациента, возможностью стандартизации.

**Принцип метода ТАБ.** Тест активации базофилов представляет собой провокационный тест, осуществляемый *in vitro* с использованием специфического аллергена, который активирует базофилы, несущие на поверхности антитела к нему. При наличии у пациента сенсибилизации к тому или иному аллергену наблюдается усиленная активация базофилов, что сопровождается

увеличением экспрессии поверхностных маркеров активации, а также появлением маркеров дегрануляции. Идентификацию базофилов, а также оценку экспрессии маркеров активации и дегрануляции, самыми значимыми из которых являются молекулы LAMP-семейства (CD63, CD107a) и специфический маркер базофилов – молекула CD203c, проводят на поверхности клеток при помощи проточного цитометра. Важным вопросом является оптимизация техники и условий проведения эксперимента для получения достоверных результатов.

**Условия постановки ТАБ.** Корректная интерпретация результатов теста активации базофилов требует наличия надежных отрицательного и положительного контролей. Отрицательный контроль необходим для оценки спонтанной активации базофилов и подразумевает инкубацию клеток в идентичных условиях, что и остальные пробы, но без использования аллергенов. Положительный контроль используют для оценки способности базофилов дегранулировать в ответ на неспецифические стимулы, что позволяет исключить ложноотрицательные реакции.

Первым и наиболее используемым положительным контролем является поли- или моноклональное антитело к IgE. Однако было показано, что для более сильной активации базофилов предпочтительнее использовать поликлональное антитело вместо моноклонального anti-IgE [16]. Усиления чувствительности положительного контроля можно добиться с помощью моноклонального антитела к FcεRI, высокоаффинного рецептора к IgE, активация которого приводит к дегрануляции базофилов и тучных клеток. Для правильной интерпретации результатов важно также соблюдение временных интервалов. Диагностику рекомендуют проводить в промежутке между 6 неделями и 12 месяцами после регистрации аллергической реакции [16]. Ненадлежащее обращение с образцом крови, хранение образца более 4 ч после забора крови, нарушение температурного режима могут привести к ложноотрицательным результатам.

Зачастую для усиления активации базофилов используют преинкубирование образцов крови с ИЛ-3 в течение 10–15 мин. ИЛ-3 представляет собой гемопоэтический ростовой фактор, который усиливает процесс дегрануляции базофилов, а также повышает реактивность базофилов в ответ на действие аллергенов, анти-IgE, fMLP и C5a, т. е. агонистов базофилов, которые сами по себе слабо активируют или вовсе не способны активировать базофилы [17]. ИЛ-3 напрямую, без необходимости костимуляции, усиливает секрецию базофилами ИЛ-13 и экспрессию активационной молекулы CD69, а также является ключевым фактором для развития и созревания костномозговых предшественников базофилов [18]. ИЛ-3 повышает чувствительность диагностики активации базофилов с помощью CD63, не изменяя при этом спонтанную экспрессию этой молекулы [19].

В то же время ИЛ-3 усиливает экспрессию CD203c на покоящихся (неактивированных) базофилах, что в свою очередь сглаживает различия между отрицательными (нестимулированными) CD203c<sup>lo</sup>/MFI<sup>hi</sup> клетками и положительными (аллерген-стимулированными) CD203c<sup>hi</sup>/MFI<sup>hi</sup> клетками [19]. Таким образом, ИЛ-3 влияет на экспрессию CD63 и CD203c по разным механизмам, что может привести к получению противоречивых результатов и снизить клиническую значимость данных маркеров. Полагают, что преинкубация исследуемой пробы с ИЛ-3 может быть оправдана при исследовании гиперчувствительности к лекарственным препаратам, которые вызывают сравнительно низкую активацию базофилов [20].

**Стратегия гейтирования базофилов в периферической крови.** При идентификации базофилов в периферической крови с использованием цитофлуориметра возникает ряд проблем. Данную популяцию клеток невозможно выделить по параметрам светорассеяния ввиду того, что базофилы распределены преимущественно в регионе мононуклеаров, обладают небольшими размерами и невысокой гранулярностью (рис. 1). Следовательно, для гейтирования базофилов необходимы моноклональные антитела к ряду специфических маркеров, которые позволяли бы выделять базофилы так, чтобы лимфоциты, моноциты, дендритные клетки и различные минорные субпопуляции клеток отсутствовали в регионе даже в небольшом количестве.

Поскольку для исследования активации и дегрануляции базофилов рекомендовано использовать комбинацию нескольких антител, выбор маркеров для идентификации должен быть ограничен их минимальным количеством. Критериями выбора антител, кроме специфичности для базофилов, флуоресцентной метки и клона, служат стабильность экспрессии и независимость ее интенсивности от состояния активации или атопического фона у пациента.

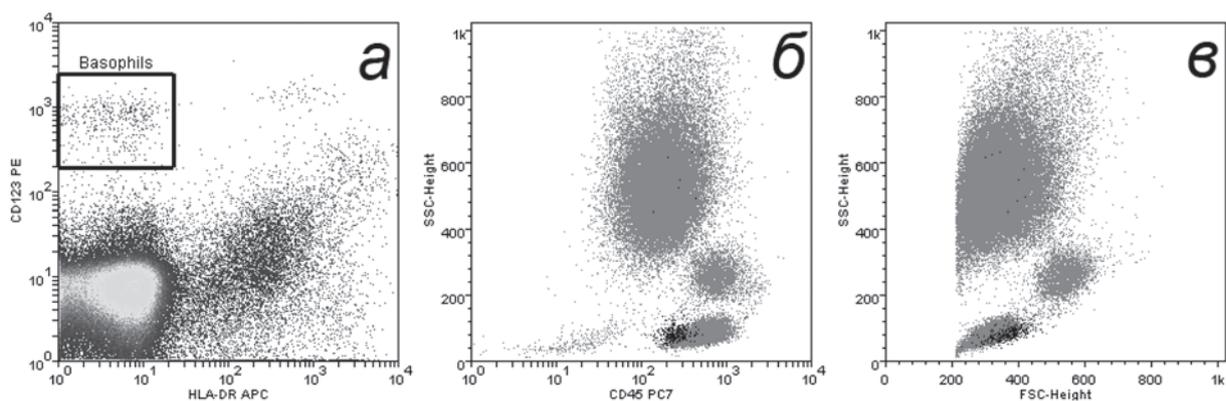


Рис. 1. Распределение  $CD123^+HLA-DR^-$  базофилов среди мононуклеаров периферической крови: *а* – выделение базофилов гейтированием по маркерам CD123 и HLA-DR; *б* – распределение базофилов среди  $CD45^+$  лейкоцитов (показано более темным цветом); *в* – распределение базофилов среди клеток периферической крови по параметрам прямого и бокового светорассеяния (показано более темным цветом)

*Способ гейтирования  $CD45^{lo}/IgE^{hi}$  или  $SSC^{lo}/IgE^+$*  [21]. На цитограммах прямого и бокового светорассеяния базофилы находятся преимущественно в регионе лимфоцитов и моноцитов [22]. Базофилы экспрессируют общий лимфоцитарный антиген CD45, но отличаются низкой интенсивностью его экспрессии (рис. 1). Для более точного выделения региона базофилов учитывают наличие экспрессии IgE ввиду присутствия рецептора высокой аффинности для IgE (FcεRI) на поверхности базофилов. Данный способ позволяет выделить базофилы от дендритных клеток, моноцитов ( $IgE^{lo}$ ) и тромбоцитов ( $CD45^-$ , реже –  $CD63^+$ ).

В течение практически 10 лет с момента начала изучения активации базофилов для идентификации базофилов использовали в основном моноклональное антитело к IgE. Соответственно, учет результатов проводился по региону, содержащему  $IgE^+$  клетки. Данный подход, преимущества которого заключались в том, что используется только один флуорохром, а большинство каналов флуоресценции для маркеров активации остаются свободными, уступил место более подходящим способам гейтирования базофилов. Ограничением для использования IgE является тот факт, что содержание IgE на базофилах у каждого человека может значительно различаться, варьируясь от 6 до 600 тыс. молекул на клетку, и при этом зависит от концентрации IgE в плазме [23]. Экспрессия высокоаффинного рецептора измеряется в диапазоне от 30 до 700 тыс. на клетку и также зависит от концентрации IgE в плазме [24]. Кроме того, плотность рецептора FcεRI на базофилах регулируется концентрацией IgE в плазме [25]. Таким образом, гейтирование базофилов с использованием антител к IgE имеет определенные ограничения, особенно у лиц с низким его содержанием в периферической крови.

*Способ гейтирования  $CD123^+HLA-DR^-$* . Молекула CD123, альфа-цепь рецептора к ИЛ-3, высоко экспрессируется на базофилах и плазматоидных дендритных клетках. Однако наличие молекулы HLA-DR не характерно для базофилов, что может служить критерием разделения данных клеточных популяций [26].

*Способ гейтирования  $CD3^-/CRTH2^+$* . Молекула CRTH2 – хемоаттрактант гомологичной рецептору молекулы, которая экспрессируется на Th2-клетках. Она называется также DP2, так как отвечает за второй рецептор к простагландину D2, интенсивно экспрессируется на базофилах [27]. Рецептор CRTH2 также присутствует на эозинофилах и Th2-лимфоцитах, однако эти клетки могут быть легко исключены из анализа с учетом существенно различающихся параметров светорассеяния у эозинофилов и экспрессии CD3-антигена Т-клетками [15]. Данный способ гейтирования базофилов применен в коммерческой тест-системе Allergenicity Kit (Beckman Coulter, США) [28].

*Способ гейтирования  $(CD3^-)/CCR3^+$* . Молекула CCR3 не является линейно-специфическим маркером и экспрессируется на поверхности большинства ассоциированных с воспалением клеток, включая базофилы, тучные клетки, Th2-лимфоциты, а также клетки эпителия дыхательных

путей. Использование данного антигена для выделения базофилов оправдано совместно с CD3 для исключения из учета Т-клеток [29]. Данный метод гейтирования используется в коммерческой тест-системе Flow CAST (Bühlmann, Швейцария) [30].

*Способ гейтирования CD203c.* В периферической крови CD203c экспрессируется исключительно на базофилах, следовательно, эта молекула может быть использована в качестве альтернативного способа идентификации базофилов [31]. Однако спонтанная экспрессия CD203c на покоящихся базофилах может быть слабой, что иногда отражается на корректном выделении базофилов [19].

*Сравнение способов гейтирования.* Каждый из способов гейтирования базофилов имеет свои преимущества и недостатки, и все эти способы различаются по удобству и качеству идентификации базофилов. Для того чтобы выбрать наиболее оптимальный вариант, важно провести сравнение различных способов гейтирования базофилов между собой. Так, в исследовании O. V. Hausmann [29] сравнивали наиболее используемые маркеры для выделения базофилов IgE и CD123<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>-</sup> с хемокиновым рецептором CCR3. Группы исследования включали пациентов с атопией и здоровых добровольцев. Оценку активации базофилов проводили как в отсутствие активации, так и при стимулировании fMLP и anti-IgE. Было показано, что наиболее постоянный уровень экспрессии наблюдался у молекулы CCR3, независимо от состояния активации или наличия гиперчувствительности у пациента. В то же время, учитывая данные о снижении CCR3 на стимулированных эозинофилах [32], активация аллергенами базофилов также вызывала небольшое снижение средней интенсивности флуоресценции CCR3, однако достоверные различия экспрессии этой молекулы на базофилах пациентов обеих групп отсутствовали, а средняя интенсивность флуоресценции IgE имела значительные отличия (усиление экспрессии отмечалось в группе пациентов с атопией). Кроме того, выявлено увеличение относительного количества клеток в выделенном регионе базофилов CCR3<sup>+</sup> в сравнении с таковым при других способах гейтирования, что свидетельствует о наименьшей примеси других клеточных популяций.

Несмотря на некоторые преимущества использования хемокинового рецептора CCR3 для идентификации базофилов, в том числе отсутствие необходимости включения в учет дополнительных антител, выбор комбинации CD123<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>-</sup> также не уступает по качеству гейтирования базофилов. Контаминация Iin<sup>+</sup> клеток составляет не более 4 %, а крайне низкая экспрессия на базофилах HLA-DR позволяет легко отделить их от плазмацитоидных дендритных клеток [29].

Нами были проведены исследования по сравнению двух способов гейтирования базофилов CD203c и CD123<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>-</sup>. Полученные данные показали, что количество базофилов, выделенных по маркеру CD203c, не отличается достоверно от количества клеток, включенных в регион CD123<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>-</sup>, что наглядно продемонстрировано на трехмерной цитограмме флуоресценции, построенной в координатах CD203c, CD123 и HLA-DR (рис. 2). Следовательно, антиген CD203c может служить надежным маркером для идентификации базофилов.

**Маркеры активации и дегрануляции базофилов.** Изучение активации базофилов с помощью молекулы CD63 для диагностики гиперчувствительности I типа было предложено в начале 1990-х годов [33]. Молекула CD63 (тетраспанин, gp53), известная также как LAMP-3, заякорена в мембране гистаминсодержащих гранул покоящихся базофилов, а в процессе дегрануляции интегрируется с поверхностной мембраной [34].

Преимущество маркера CD63 состоит в том, что он напрямую отражает дегрануляцию базофилов по принципу «все или ничего» [35]. Однако молекула CD63 может также экспрессироваться на активированных лейкоцитах, макрофагах и тромбоцитах, которые при этом могут быть адгезированы к базофилам. Феномен адгезии тромбоцитов на базофилах на практике не оказал никакого влияния на результаты, полученные при исследовании кластера CD63-позитивных клеток с использованием для доказательства специфической молекулы для тромбоцитов CD41 [36]. Кроме того, только базофилы способны к активации под действием аллергенов, следовательно, адгезированные на базофилах тромбоциты не влияют на чувствительность данного маркера для диагностики аллергии [37]. Чувствительность теста с использованием только

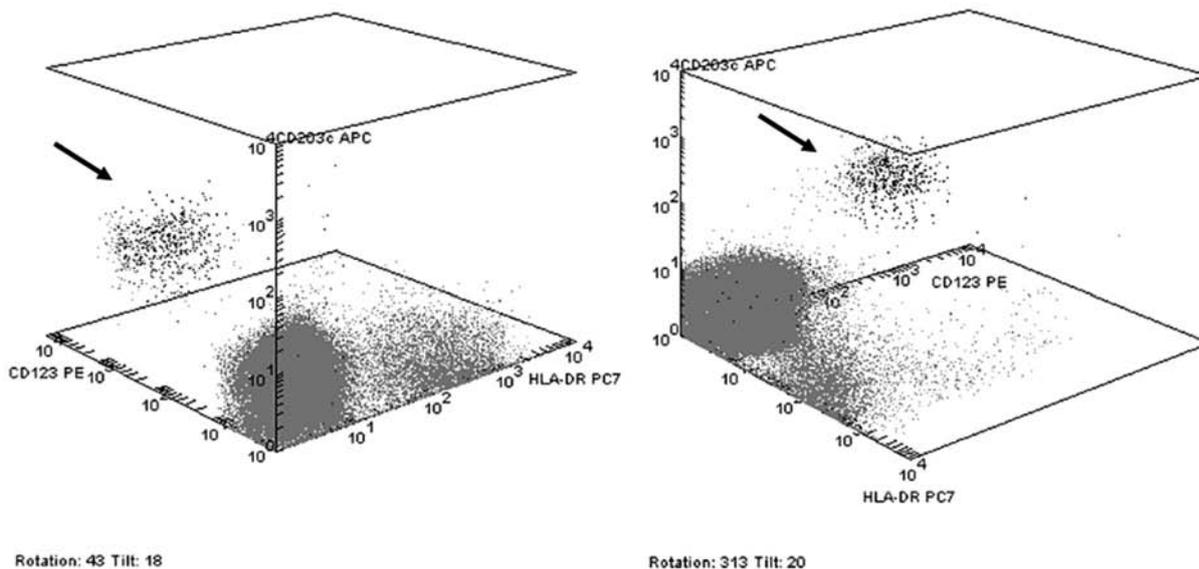


Рис. 2. Сравнение двух способов гейтирования базофилов ( $CD203c$  и  $CD123^+HLA-DR^-$ ), иллюстрированное при помощи трехмерной цитограммы (видно, что все  $CD123^+HLA-DR^-$  клетки экспрессируют молекулу  $CD203c$ , а  $CD123^-CD203c^+$  клетки отсутствуют)

$CD63$  не всегда высокая, особенно в отношении лекарственной аллергии [38, 39].  $CD63$  обладает преимуществом перед определением специфических IgE в связи с тем, что не имеет заметных индивидуальных различий, а следовательно, необходимое количество  $CD63$ -позитивных базофилов всегда достигается при учете на цитофлуориметре [40].

Маркер активации базофилов  $CD203c$  представляет собой поверхностную молекулу, принадлежащую к семейству трансмембранных белков II типа, и является мультифункциональным экзоферментом – эктонуклеотид-пирофосфатаза/фосфодиэстеразой-3 [41]. Данный фермент катализирует расщепление большого количества молекул, включая деоксинуклеотиды и нуклеотидные сахара [42].  $CD203c$  обнаружен исключительно на базофилах и тучных клетках, а также на их предшественниках. Экспрессия молекулы значительно усиливается после активации базофилов в присутствии аллергена или в процессе кросс-презентации  $Fc\epsilon RI$  антителами к IgE [43]. Повышение специфичности определения  $CD203c$  при активации базофилов в сравнении с  $CD63$  делает его более приемлемым для диагностики аллергии [44, 45]. Преимущество  $CD203c$  в том, что с его помощью можно определять как активированные, так и покоящиеся базофилы [46]. Однако для повышения чувствительности исследования предлагается оценивать на базофилах экспрессию обоих маркеров, учитывая различные сигнальные пути активации.

Какой маркер активации базофилов для диагностики аллергии является наиболее подходящим? При сравнении маркеров  $CD63$  и  $CD203c$  для диагностики гиперчувствительности в нескольких исследованиях были получены противоречивые результаты [47–49]. Так, поскольку экспрессия  $CD203c$  отмечается только на базофилах, тучных клетках или на их предшественниках, выделение базофилов по данному маркеру (как активированных, так и неактивированных) значительно упрощается. Однако в связи с этим затруднено разграничение между покоящимися и активированными клетками. В то же время экспрессия  $CD63$  на покоящихся базофилах составляет менее 1 %, тогда как на активированных базофилах она заметно усиливается. В настоящее время приведен ряд доказательств (построение ROC-кривой) равноценной значимости обоих маркеров для исследования активации базофилов [31].

С целью усиления чувствительности метода были предложены новые маркеры активации и дегрануляции базофилов, в частности  $CD13$ ,  $CD64$  и  $CD107a$  [50]. Наибольший практический интерес в качестве дополнительного маркера дегрануляции получил антиген  $CD107a$  (LAMP-1), входящий, так же как и молекула  $CD63$ , в семейство лизосомально-ассоциированных мембран-

ных липопротеинов [51]. Более того, предположительно CD63 и CD107a находятся внутри одних и тех же гранул базофилов, о чем говорит схожая кинетика появления этих маркеров на поверхности клетки под действием активатора [50].

**Практическое применение ТАБ.** В связи с не до конца изученными механизмами действия лекарств возможности диагностики лекарственной аллергии на сегодняшний день ограничены. Поскольку большинство медицинских средств являются низкомолекулярными соединениями, они не способны к перекрестному связыванию молекул IgE, расположенных на базофилах. Большое разнообразие клинических проявлений лекарственной непереносимости и существующая в настоящее время полипрагмазия также затрудняют поиск «виновного» лекарственного средства. Тест активации базофилов для диагностики лекарственной аллергии наиболее оправдан в тех случаях, когда аллергенами выступают либо крупные молекулярные структуры, либо низкомолекулярные вещества, способные связываться с белками в организме. По сравнению с пищевой аллергией и гиперчувствительностью к аэроаллергенам диагностика лекарственной аллергии с помощью ТАБ характеризуется меньшей чувствительностью, так как химические вещества вызывают более низкую активацию базофилов в отличие от аллергенов белковой природы. При этом, например, при исследовании лекарственной аллергии к нестероидным противовоспалительным средствам (НПВС) с помощью ТАБ основываются на повышении чувствительности базофилов к данной группе препаратов без участия IgE [52]. Вероятно, с целью усиления чувствительности ТАБ для диагностики лекарственной аллергии необходимо исследовать не только поверхностные активационные молекулы, но и непосредственно связанные с активацией базофилов внутриклеточные факторы, например p38 MAP киназу [52]. Кроме того, для усиления чувствительности, а также специфичности диагностики лекарственной аллергии дополнением к тесту может служить изучение продукции цитокинов специфическими к лекарственным препаратам Т-лимфоцитами, например интерферон (ИНФ)- $\gamma$ , ИЛ-2, ИЛ-5, ИЛ-8 и ИЛ-12 [53, 54].

К настоящему времени показана эффективность диагностики лекарственной аллергии с помощью ТАБ для таких групп лекарственных препаратов, как бета-лактамы антибиотики, миорелаксанты, некоторые препараты из группы НПВС, фторхинолоны, радиоcontrastные вещества, а также новые биологические препараты (ритуксимаб, L-аспарагиназа) и др. [14].

Бета-лактамы антибиотики и миорелаксанты являются первыми препаратами, для которых был успешно применен ТАБ. В частности, поскольку чувствительность ТАБ для диагностики бета-лактамов на 10 % выше других коммерческих тестов определения специфического IgE [55, 56], а специфичность результатов составляет более 90 %, тест активации базофилов показывает высокую клиническую значимость диагностики аллергии для данной группы препаратов.

Нестероидные противовоспалительные препараты представляют собой гетерогенную группу лекарственных средств, основным свойством которых является ингибирование синтеза простагландинов. Мнение исследователей относительно эффективности ТАБ для диагностики непереносимости НПВС в большинстве исследований сходится на невысокой клинической значимости данной диагностики, особенно для пациентов с нетяжелыми реакциями гиперчувствительности или с кожными проявлениями. Однако, несмотря на то что под действием аспирина происходит неспецифическая активация базофилов [57], эффективность ТАБ для диагностики аллергии на аспирин можно обосновать дозозависимым эффектом, а также фармакологическим действием ингибирования синтеза простагландина E<sub>2</sub>, представляющего собой естественный ингибитор активации базофилов. Поиски способов усиления чувствительности ТАБ для диагностики аллергии на НПВС продолжаются [9].

Применение теста активации базофилов для диагностики аллергии на фторхинолоны представляет особый интерес, поскольку результаты кожных проб вследствие раздражающих свойств препаратов данной группы в основном ложноположительные (до 88 %) [58]. Результаты ТАБ по отношению к фторхинолонам показывают как высокую чувствительность (до 71,1 %), так и максимальную специфичность результатов (от 90 до 100 %) [59, 60].

**Заключение.** Цитометрическая диагностика гиперчувствительности в клинической практике особенно показана в том случае, если у пациента в анамнезе наблюдалась анафилактическая реакция, при этом кожные тесты могут быть отрицательными, а проведение провокационных

проб – опасным. Несмотря на существующие проблемы стандартизации метода активации базофилов на цитофлуориметре, результаты многих исследований, полученные в течение последних нескольких лет, говорят о том, что ТАБ является прогрессивным методом диагностики аллергии *in vitro*, так как даже применение различных протоколов постановки ТАБ позволяет получить воспроизводимые и значимые результаты [61]. Таким образом, ТАБ дает возможность дополнить результаты имеющихся методов аллергологического обследования, а в некоторых случаях – послужить безальтернативным способом выявления причинного аллергена.

## Литература

1. Papadopoulos N. G. et al. // Clin. Transl. Allergy. 2012. Vol. 2, N 1. P. 1–21.
2. Warner J. O. et al. // Int. Arch. Allergy Immunol. 2006. Vol. 139, N 2. P. 166–174.
3. Mukai K., Obata K., Tsujimura Y., Karasuyama H. // Allergol. Int. 2009. Vol. 58, N 1. P. 11–19.
4. Arinobu Y., Iwasaki H., Akashi K. // Allergol. Int. 2009. Vol. 58, N 1. P. 21–28.
5. Siracusa M. C. et al. // Immunol. Cell Biol. 2010. Vol. 88, N 3. P. 275–284.
6. Falcone F. H., Haas H., Gibbs B. F. // Blood. 2000. Vol. 96, N 13. P. 4028–4038.
7. Knol E. F., Olszewski M. // Immunol. Lett. 2011. Vol. 138, N 1. P. 28–31.
8. Barnes P. J. // Immunol. Rev. 2011. Vol. 242, N 1. P. 31–50.
9. De Week A. L., Sanz M. L., Gamboa P. M. et al. // J. Investig. Allergol. Clin. Immunol. 2008. Vol. 18, N 3. P. 143–155.
10. Falcone F. H., Haas H., Gibbs B. F. // Blood. 2000. Vol. 96, N 13. P. 4028–4038.
11. Sainte-Laudy J., Vallon C., Guérin J. C. // Allerg. Immunol. (Paris) 1994. Vol. 26, N 6. P. 211–214.
12. Zambonino M. A., Torres M. J., Muñoz C. et al. // Pediatr. Allergy Immunol. 2013. Vol. 24, N 2. P. 151–159.
13. Brockow K., Garvey L. H., Aberer W. // Allergy. 2013. Vol. 68, N 6. P. 702–712.
14. Song W.-J., Chang Y.-S. // Asia Pac. Allergy. 2013. Vol. 3, N 4. P. 266–280.
15. Boumiza R., Debard A. L., Monneret G. // Clin. Mol. Allergy. 2005. Vol. 30, N 3. P. 1–9.
16. Ebo D. G., Sainte-Laudy J., Bridts C. H. et al. // Allergy. 2006. Vol. 61, N 9. P. 1028–1039.
17. Kurimoto Y., De Week A. L., Dahinden C. A. // Eur. J. Immunol. 1991. Vol. 21, N 2. P. 361–368.
18. Redrup A. C., Howard B. P., MacGlashan D. et al. // J. Immunol. 1998. Vol. 160, N 4. P. 1957–1964.
19. Ocmant A., Peignois Y., Mulier S. et al. // J. Immunol. Meth. 2007. Vol. 320, N 1–2. P. 40–48.
20. Ebo D. G., Bridts C. H., Hagendorens M. M. et al. // Cytometry B Clin. Cytom. 2008. Vol. 74, N 4. P. 201–210.
21. Eberlein-König B. et al. // J. Investig. Allergol. Clin. Immunol. 2004. Vol. 14, N 1. P. 10–16.
22. Gane P., Pecquet C., Lambin P. et al. // Cytometry. 1993. Vol. 14, N 3. P. 344–348.
23. Stallman P. J. // Scand. J. Respir. Dis. Suppl. 1977. Vol. 98. P. 23–24.
24. Malveaux F. J., Conroy M. C., Adkinson N. F. Jr., Lichtenstein L. M. // J. Clin. Invest. 1978. Vol. 62, N 1. P. 176–181.
25. MacGlashan D. // Ann. N. Y. Acad. Sci. 2005. Vol. 1050. P. 73–88.
26. Wanich N., Nowak-Wegrzyn A., Sampson H. A., Shreffler W. G. // J. Allergy Clin. Immunol. 2009. Vol. 123, N 4. P. 789–794.
27. Hirai H., Tanaka K., Yoshie O. et al. // J. Exp. Med. 2001. Vol. 193, N 2. P. 255–261.
28. Allergenicity Kit // Beckman Coulter, Inc. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.beckmancoulter.com/wsrportal/wsr/diagnostics/clinical-products/flow-cytometry/allergenicity-kit/index.htm>. – Дата доступа: 17.09.2014.
29. Hausmann O. V., Gentinetta T., Fux M. et al. // Allergy. 2011. Vol. 66, N 1. P. 85–91.
30. Flow CAST® // Bühlmann Laboratories AG [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.buhlmannlabs.ch/core/allergy/flow2-cast>. – Дата доступа: 17.09.2014.
31. Mikkelsen S., Bibby B. M., Dolberg M. K. et al. // Clin. Mol. Allergy. 2010. Vol. 8. P. 1–9.
32. Dulkys Y., Kluthe C., Buschermöhle T. et al. // J. Immunol. 2001. Vol. 167, N 6. P. 3443–3453.
33. Knol E. F., Mul F. P., Jansen H. et al. // J. Allergy Clin. Immunol. 1991. Vol. 88, N 3. Pt. 1. P. 328–338.
34. Metzelaar M. J., Wijngaard P. L., Peters P. J. et al. // J. Biol. Chem. 1991. Vol. 266, N 5. P. 3239–3245.
35. Füreder W., Agis H., Sperr W. R. et al. // Allergy. 1994. Vol. 49, N 10. P. 861–865.
36. Sainte-Laudy J. // Allerg. Immunol. (Paris). 1998. Vol. 30, N 2. P. 41–43.
37. Sainte-Laudy J., Sabbah A., Vallon C., Guerin J. C. // Inflamm. Res. 1998. Vol. 47, N 10. P. 401–408.
38. Monneret G., Benoit Y., Debard A. L. et al. // Clin. Immunol. 2002. Vol. 102, N 2. P. 192–199.
39. Sanz M. L., Gamboa P. M., Antépara I. et al. // Clin. Exp. Allergy. 2002. Vol. 32, N 2. P. 277–286.
40. Sanz M. L., Maselli J. P., Gamboa P. M. et al. // J. Invest. Allergol. Clin. Immunol. 2002. Vol. 12, N 3. P. 143–154.
41. Bühring H. J., Seiffert M., Giesert C. et al. // Blood. 2001. Vol. 97, N 10. P. 3303–3305.
42. Bollen M., Gijssbers R., Ceulemans H. et al. // Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 2000. Vol. 35, N 6. P. 393–432.
43. Platz I. J., Binder M., Marxer A. et al. // Int. Arch. Allergy Immunol. 2001. Vol. 126, N 4. P. 335–342.
44. Bühring H. J., Streble A., Valent P. // Int. Arch. Allergy Immunol. 2004. Vol. 133, N 4. P. 317–329.
45. Kahlert H., Cromwell O., Fiebig H. // Clin. Exp. Allergy. 2003. Vol. 33, N 9. P. 1266–1267.
46. Bühring H. J., Simmons P. J., Pudney M. et al. // Blood. 1999. Vol. 94, N 7. P. 2343–2356.
47. Boumiza R., Monneret G., Forissier M. F. et al. // Clin. Exp. Allergy. 2003. Vol. 33, N 2. P. 259–265.
48. Sudheer P. S., Hall J. E., Read G. F. et al. // Anaesthesia. 2005. Vol. 60, N 3. P. 251–256.
49. Eberlein-König B., Varga R., Mempel M. et al. // Allergy. 2006. Vol. 61, N 9. P. 1084–1085.

50. *Hennersdorf F., Florian S., Jakob A.* et al. // *Cell Res.* 2005. Vol. 15, N 5. P. 325–335.
51. *Carlsson S. R., Fukuda M.* // *Arch. Biochem. Biophys.* 1992. Vol. 296, N 2. P. 630–639.
52. *Hausmann O. V., Gentinetta T., Bridts C. H., Ebo D. G.* // *Immunol. Allergy Clin. North. Am.* 2009. Vol. 29, N 3. P. 555–566.
53. *Romano A., Torres M. J., Castells M.* et al. // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011. Vol. 127, N 3 (Suppl.). P. S67–S73.
54. *Rozieres A., Vocanson M., Saïd B. B.* et al. // *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2009. Vol. 9, N 4. P. 305–310.
55. *De Week A. L., Sanz M. L., Gamboa P. M.* et al. // *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.* 2009. Vol. 19, N 2. P. 91–99.
56. *Gamboa P. M., García-Avilés M. C., Urrutia I.* et al. // *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.* 2004. Vol. 14, N 4. P. 278–283.
57. *Celik G. E., Schroeder J. T., Hamilton R. G.* et al. // *Clin. Exp. Allergy.* 2009. Vol. 39, N 10. P. 1522–1531.
60. *Perez E., Callero A., Martinez-Tadeo J. A.* et al. // *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2013. Vol. 111, N 5. P. 423–425.
61. *Aranda A., Mayorga C., Ariza A.* et al. // *Allergy.* 2011. Vol. 66, N 2. P. 247–254.
62. *Ben Said B., Berard F., Bienvenu J.* et al. // *Allergy.* 2010. Vol. 65, N 4. P. 535–536.
63. *De Week A. L., Sanz M. L., Gamboa P. M.* et al. // *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.* 2008. Vol. 18, N 3. P. 143–155.

*I. U. RAMANA, A. Y. HANCHAROU, V. A. HARBUNOU*

**THE ROLE OF BASOPHILS IN ALLERGIC REACTIONS  
AND FLOW CYTOMETRIC METHODS OF ESTIMATION BASOPHIL ACTIVATION**

**Summary**

The method of *in vitro* diagnostics of allergy based on flow cytometric detection of markers of activation and degranulation is described. Some technical aspects of test application are discussed. Advantages and disadvantages of basophil activation test (BAT) are estimated, emphasizing on the possibility of BAT application in the diagnostics of drug hypersensitivity.

нения коры больших полушарий головного мозга, не одинаково выраженные в разных ее отделах: уменьшение толщины коры и снижение в ней количества нейронов 5-го слоя коры (особенно в париетальной коре), уменьшение числа нормохромных и увеличение числа гиперхромных сморщенных, гипохромных нейронов и клеток-теней во всех изучаемых отделах коры и снижение содержания РНП в нейронах 5-го слоя, особенно в париетальной коре. При этом нарушение формы, вытягивание нейронов происходит только в этом отделе коры. Следовательно, наибольшее повреждающее действие пренатальная алкоголизация оказывает на развитие филогенетически молодой, париетальной коры, а наименьшие изменения – в филогенетически старой, цингулярной коре.

Табл. 2. Ил. 2. Библиогр. – 20 назв.

УДК 616-006.2.04:52.017.6]-053.3

Бегун И. В., Красько О. В., Зборовская А. А., Алейникова О. В. **Особенности развития злокачественных эмбриональных опухолей у детей первого года жизни** // Весці НАН Беларусі. Сер. мед. навук. 2014. № 4. С. 102–108.

По результатам первичной ультразвуковой диагностики злокачественных новообразований у 114 детей обоего пола в возрасте 1–366 сут, поступивших для обследования и лечения в специализированные детские онкологические отделения ГУ РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова, РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии в период с 1990 по 2014 г., изучены объемные характеристики эмбриональных опухолей в возрастном аспекте. Проанализированы данные детей с морфологически подтвержденными диагнозами нефробластомы ( $n = 32$ ), забрюшинной нейробластомы и нейробластомы надпочечника ( $n = 62$ ), гепатобластомы ( $n = 20$ ). В ходе статистических расчетов получен возрастной период в первом полугодии жизни заболевшего ребенка, который предполагает возможность визуализации злокачественного новообразования на ранних стадиях и при объемах, значительно меньших фактически диагностируемых.

Табл. 3. Ил. 2. Библиогр. – 50 назв.

УДК 616.728.3-71-018.3-072.1-001-08-07

Исайкина Я. И., Жерносеченко А. А., Алейникова О. В. **Потенциал культивированных мезенхимальных стволовых клеток человека для восстановления дефектов хряща** // Весці НАН Беларусі. Сер. мед. навук. 2014. № 4. С. 109–114.

Представлен обзор научных публикаций по созданию биоинженерных конструкций на основе *in vitro* полученных мезенхимальных стволовых клеток (МСК) и их дальнейшему клиническому применению для репарации дефектов хрящевой поверхности суставов. Особое внимание уделено подбору оптимальных условий генерирования таких биоконструкций, а именно: степени дифференцировки клеток в хондрогенном направлении; поиску наиболее эффективного носителя МСК, обладающего свойством обеспечить интеграцию клеточной конструкции с окружающими тканями хряща; установлению оптимального состава цитокинов и гормонов, инициирующих хондрогенез *in vitro* и индуцирующих экспрессию генов, отвечающих за синтез коллагена II и протеогликанов, участвующих в формировании гиалинового хряща.

Библиогр. – 40 назв.

УДК 616-056.3+612.112.93:571.27

Романова И. В., Гончаров А. Е., Горбунов В. А. **Роль базофилов в аллергических реакциях и цитофлуориметрические методы определения их активации** // Весці НАН Беларусі. Сер. мед. навук. 2014. № 4. С. 115–123.

Подробно описан метод диагностики аллергии *in vitro*, основанный на цитофлуориметрическом определении маркеров активации и дегрануляции базофилов. Рассмотрены некоторые технические аспекты выполнения теста активации базофилов, оценены преимущества и недостатки данного метода и возможность его применения в диагностике лекарственной гиперчувствительности.

Ил. 2. Библиогр. – 63 назв.