# Streszczenie

Zapadalność na choroby alergiczne dynamicznie narasta. Wciąż nie udało się znaleźć optymalnej metody diagnostycznej, a stosowany obecnie złoty standard – wywiad lekarski, punktowe testy skórne i w niektórych przypadkach oznaczanie alergenowo swoistego IgE, są czasami niewystarczające. Dodatkowo wymienione metody nie są pozbawione wad – wyłania się potrzeba poszukiwania nowych, coraz lepszych i bardziej dostosowanych do indywidualnych potrzeb pacjentów metod diagnostycznych

W niniejszej pracy podjęto próbę zaproponowania nowego protokołu w testach aktywacji bazofila (BAT, z ang. *Basophil Activation Test*). Wykonano test wiązania aneksyny-V na powierzchni bazofila w diagnostyce uczulenia na żyto. Zdecydowano się na protokół identyfikacji z wykorzystaniem anty-CCR3, aktywację wyznaczono na podstawie zmiany ekspresji wiązania aneksyny-V na powierzchni bazofila.

Badanie przeprowadzono na grupie 69 osób, (32 osoby z grupy kontrolnej – bez objawów klinicznych i 37 osób uczulonych na żyto). U wszystkich badanych wykonywano punktowe testy skórne (nie akceptując współistnienia innych chorób alergicznych w grupie kontrolnej), oznaczono alergenowo swoiste IgE oraz test wiązania aneksyny-V na powierzchni bazofila (wykorzystując wyciąg alergenowy żyta w trzech stężeniach: C1 = 500 SBU/ml, C2 = 50 SBU/ml, C3 = 5 SBU/ml).

Analizę statystyczną wykonano za pomocą programu Statistica 12.5 z dostosowaną do niego nakładką medyczną. Przeanalizowano rozkłady poszczególnych parametrów i dobrano odpowiednie testy statystyczne. Ze względu na brak normalności rozkładów hipotezę
o równości średnich wartości badanych parametrów weryfikowano nieparametrycznym testem U Manna-Whitneya. Wykorzystując krzywe ROC (z ang. *Receiver Operating Characteristic*), zbadano efekt diagnostyczny testów (poszczególne stężenia alergenów w BAT
i oznaczenie swoistego IgE). Posiłkując się wyznaczoną wartością indeksu Youdena, wyznaczono optymalny punkt odcięcia, dla którego suma czułości i swoistości jest największa. Porównano również łączną czułość i skuteczność obu badanych w pracy testów in vitro.

Wykonane badania pozwalają wnioskować o stabilności wykorzystanego markera identyfikacji – anty-CCR3. Zaletą protokołu jest fakt, że nie wymaga zastosowania dodatkowych barwników, a jego ekspresja nie zmienia się znacząco wraz z aktywacją bazofili. Nie jest to jednak protokół bez wad – istnieje możliwość występowania aktywowanych limfocytów Th2 (nie stanowią one jednak dużego odsetka zidentyfikowanych komórek).

Nie wykazano różnic statystycznych wielkości aktywacji bazofili w przypadku stymulacji swoistej i nieswoistej (Pb i Pc). Zaobserwowano natomiast istotnie statystyczne różnice pomiędzy grupami w przypadku stymulacji wyciągiem alergenowym żyta (we wszystkich trzech badanych stężeniach wartość krytyczna p była mniejsza od 10-5).

Badania nad możliwością stosowania aneksyny-V jako markera aktywacji pozwoliły na uzyskanie zachęcających wyników.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Badana grupa (test, alergen) | Próg odcięcia [%] | Czułość | Swoistość |
| BAT, wyciąg alergenowy żyta C1 = 500 SBU/ml | 3,92 | 97% | 100% |
| BAT, wyciąg alergenowy żyta C2 = 50 SBU/ml | 5,77 | 95% | 100% |
| BAT, wyciąg alergenowy żyta C3 = 5 SBU/ml | 4,87 | 75% | 100% |
| sIgE, wyciąg alergenów żyta *Secale cereale*, g12 | 0,21 | 97% | 97% |

Wyniki badań testów aktywacji bazofila, wykonanych w pracy, cechowały się taką samą czułością 97% i wyższą swoistością (100%) w stosunku do metody referencyjnej, jaką było oznaczanie alergenowo swoistego IgE. Zestawienie wyników z obu tych metod (oznaczenie alergenowo swoistego IgE i wynik testu wiązania aneksyny-V), pozwoliło na uzyskanie 100% czułości i swoistości. Prowadzić to może do poszerzenie możliwości diagnostycznych
w obszarze badanego profilu uczuleń.

Porównując markery aktywacji: aneksynę-V do popularnie stosowanego CD63 (uznawanego za złoty standard w testach aktywacji bazofili), stwierdzono, że otrzymywane wartości czułości i swoistości są zbliżone. Pozwala to wnioskować o zasadności stosowania aneksyny-V jako markera aktywacji.

Sama metodologia przygotowania próbki i wykonania procedury została uproszczona. Poprzez prowadzenie równoczesnej identyfikacji i stymulacji bazofili skrócono czas procedury. Udało się również obniżyć koszty – było to wynikiem zastosowania pojedynczych markerów w kluczowych etapach testów (przy identyfikacji i aktywacji), ale również wykorzystaniem wyciągów alergenowych stosowanych w testach skórnych.

Wykonane w niniejszej pracy pionierskie badania nad wykorzystaniem aneksyny-V jako markera aktywacji mogą przyczynić się do rozwoju diagnostyki, która zaowocuje wprowadzeniem dokładnej i czułej metody wykorzystującej nowoczesną technologię. Metoda może znaleźć zastosowanie szczególnie w przypadkach, w których nie można stosować innych popularnych metod diagnostycznych (np. choroby skórne) bądź istnieje ryzyko wywołania groźnych dla życia i zdrowia powikłań (np. u dzieci, kobiet w ciąży czy osób, u których współistnieją inne choroby). Testy aktywacji bazofila wciąż niesłusznie uznaje się za metodę niedostosowaną do rutynowej diagnostyki. Wykonana praca może pomóc wpłynąć na zmianę tej opinii.

# Summary

Due to significant changes in human environment the incidence of allergic diseases is growing rapidly. The optimal method of allergy diagnosis has not been found yet. Currently exploited gold standard, which includes clinical interview, skin prick test, and occasionally an allergen-specific IgE antibody test, is often insufficient. These methods often lack the needed sensitivity and specificity. Moreover, skin prick tests may lead to serious complications. Therefore the need for seeking better and more personalized diagnostic methods emerges.

In this study a new protocol for basophil activation test (BAT) has been proposed. In this protocol, CCR3 has been used for identification and the activation has been determined on the basis of change in annexin-V expression on the basophil surface.

The test material was collected from 69 people, 32 control samples from people with no clinical symptoms and 37 samples from people allergic to secale. Both groups were treated with skin prick tests (coexistence of any other allergies were not accepted in the control group), allergen-specific IgE antibody test, and finally the test for bonding annexin-V on the basophil surface (using the secale allergen extract in three concentrations: C1 = 500 SBU/ml, C2 = 50 SBU/ml, C3 = 5 SBU/ml).

The statistical analysis was performed using Statistica 12.5 with medical pack. The distribution of every parameter was analyzed and the appropriate statistical testes were chosen. Due to lack of normal distribution, the hypothesis on the equal average value of both parameters was verified with the Mann-Witney test. Using Receiver Operating Characteristic (ROC), the diagnostic usefulness was tested (various allergen concentration in BAT, allergen-specific IgE antibody test). With obtained value of the Youden index, the optimal threshold (for which the sum of sensitivity and specificity is maximal) was determined. Also the conjoined specificity and sensitivity of both tests was compared.

Obtained results suggest that anti-CCR3 is a stable identification marker. It’s advantage is that it does not require usage of additional dyes and it’s expression does not change significantly after basophil activation. The downside of the protocol is that it also includes the present activated Th2 lymphocytes. However, Th2 lymphocytes do not constitute a significant fraction of identified cells.

There were no differences of statistical differences in basophil activation between specific and nonspecific stimulation (Pb i Pc). However, the significant statistical differences between the groups was observed after stimulation with secale allergen extract. For all three allergen concentrations the p threshold was less than 10-5).

The research on using the annexin-V as marker for basophil activation has shown some promising results.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Group (test, allergen) | Threshold [%] | Sensitivity | Selectivity |
| BAT, secale allergen extract C1 = 500 SBU/ml | 3,92 | 97% | 100% |
| BAT, secale allergen extract C2 = 50 SBU/ml | 5,77 | 95% | 100% |
| BAT, secale allergen extract C3 = 5 SBU/ml | 4,87 | 75% | 100% |
| sIgE, secale allergen extract *Secale cereale*, g12 | 0,21 | 97% | 97% |

Results obtained in this study showed the same sensitivity (97%) and greater selectivity (100%) in comparison to the reference method – allergen-specific IgE antibody test. Moreover, when combining these two methods (allergen-specific IgE antibody test + BAT), the specificity and sensitivity reached 100%. This can lead to greater diagnostic possibilities within the tested allergy profile.

The specificity and sensitivity results for annexin-V were comparable to results of widely used CD63, which is considered to be a standard marker for basophil activation tests. Therefore using annexin-V in BAT is justified.

In proposed protocol, both preparation of the sample and conduction of the procedure have been simplified. Thanks to simultaneous performance of identification and basophil stimulation, the duration of the procedure has been shortened. Also the cost of the procedure has been cut by using single markers in the crucial stages of the test (identification and activation) and utilizing the allergen extracts used for skin prick tests.

The pioneer research on using the annexin-V as the basophil activation marker performed in this study may contribute to emerge of the specific and sensitive hi-tech diagnostic method. This method would be especially useful in the cases where the standard methods are limited. For example it can be used for diagnosing patients with skin diseases. It can also be used to avoid inducing severe complications, which is crucial for children, pregnant woman and patients with suppressed immune system. With appropriately matched identification protocols and activation markers, flow cytometry can become the next allergy diagnosis method. There is a growing interest in BAT, however it is still often considered not sufficient for becoming the routine diagnosis method. This study might help to change that opinion.