
НОВЫЕ МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ И КОНТРОЛЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ АЛЛЕРГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

О.А. Ежова

Клиника астмы и иммунологии
ул. Маршала Голованова, д. 1, стр. 2, Москва, Россия

**Н.Н. Хлебникова, И.Б. Алчинова,
Е.Н. Архипова, М.Ю. Карганов**

Лаборатория полисистемных исследований
ГУ НИИ ОПП РАМН
ул. Балтийская, д. 8, Москва, Россия, 125315

В.И. Торшин

Российский Университет Дружбы народов
ул. Миклухо-Маклая, д. 8, Москва, Россия, 117198

Впервые в аллергологической клинической практике были применены новые методы лабораторной диагностики и контроля эффективности проводимой терапии: лазерная корреляционная спектрометрия (ЛКС) и анализ токсичности сыворотки крови и мочи для сперматозоидов быка (АТ). Методы позволяют эффективно осуществлять скрининговую этиологическую диагностику аллергических заболеваний, определять степень тяжести патогенетического процесса и контролировать состояние защитных систем организма в ходе лечения. Адекватная диагностика обеспечивает индивидуальный подход к выбору терапевтического протокола, что позволяет рассчитывать на длительную ремиссию заболевания.

По данным литературы, количество людей, страдающих аллергическими заболеваниями, колеблется в различных популяциях от 20 до 40—50% [5]. Проблема диагностики и лечения таких пациентов остается одной из актуальных в современной медицине. В последние годы наблюдается тенденция к широкому применению в практике врачей-аллергологов безопасных методов, позволяющих *in vitro* выявить дефект иммунной системы и контролировать эффективность применяемых иммунокорректоров. К таким методам относится лазерная корреляционная спектрометрия (ЛКС) и спермомобилометрический метод оценки состояния гуморальных защитных систем организма, которые активно используются в клинике. Метод ЛКС успешно применяется для ранней диагностики гематологических заболеваний, сахарного диабета, пародонтита и некоторых других патологий [1, 6]. Скрининг токсичности биологических жидкостей используется в отделениях реанимации для оценки состояния пациентов после хирургических операций [4].

Целью настоящего исследования являлась оценка диагностической и прогностической значимости указанных методов в практике врача-аллерголога.

Материалы и методы исследования. Работа выполнена на образцах сыворотки крови и мочи пациентов, страдающих различными формами аллергии ($n = 249$; из них 117 — мужчины, 132 — женщины). Средний возраст больных составил $34,4 \pm 2$ года.

В качестве контроля использовали кровь и мочу здоровых доноров ($n = 145$; 68 — мужчины, 77 — женщины, средний возраст — $38,2 \pm 1$ лет), не имеющих клинических проявлений аллергических реакций на пищевые, бытовые, пыльцевые и лекарственные аллергены. Состояние здоровья доноров соответствовало регламентам закона Российской Федерации от 9 июня 1993 г. № 5142-1 «О донорстве крови, ее компонентов». Образцы сыворотки и мочи готовили по стандартной методике и хранили при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ до проведения исследования.

Для оценки токсичности сыворотки крови и мочи использовали биологическую тест-систему — кратковременную суспензионную культуру подвижных сперматозоидов быка. Изменение двигательной активности сперматозоидов под воздействием сыворотки крови и мочи измеряли на анализаторе токсичности АТ-04 по описанной ранее методике [4]. Субфракционный состав образцов оценивали методом лазерной корреляционной спектроскопии (ЛКС) [1]. Технические характеристики лазерного корреляционного спектрометра ЛКС-03 («ИНТОКС», Санкт-Петербург) позволяют определять светорассеивающие частицы с размерами от 1 до 10000 нм. Распределение частиц по размерам, представленное в виде гистограммы, позволяет охарактеризовать дисперсный состав конкретной биологической жидкости и классифицировать распределения в соответствии с характерными для каждой системы информативными зонами спектра [1]. Предполагается, что нарастание площадей низко- и среднемолекулярных мод ЛК-спектров свидетельствует о преобладании процессов биосубстратной деградации («катаболические» процессы), а высоко- и сверхвысокомолекулярных мод — о преобладании процессов биосубстратной полимеризации («анаболические» процессы).

Анализ полученных показателей проводили с помощью пакета статистических программ «Statistica 6.0», используя стандартные параметрические и непараметрические критерии вариационной статистики.

Результаты исследований и обсуждение. В ходе начального этапа исследований выявили существенные различия в распределении частот встречаемости отдельных значений индекса токсичности крови (ИТК) и индекса токсичности мочи (ИТМ) у здоровых людей и пациентов с различными аллергопатологиями ($p < 0,05$; критерий Колмогорова-Смирнова). Среднее значение ИТК в группе пациентов оказалось значимо выше, а ИТМ — ниже, чем в группе доноров (табл. 1).

Таблица 1

Показатели токсичности мочи и активности комплемента у здоровых людей и пациентов с аллергическими заболеваниями

Показатель	Токсичность крови (ИТК)		Токсичность мочи (ИТМ)	
	доноры, $n = 145$	пациенты, $n = 188$	доноры, $n = 115$	пациенты, $n = 249$
Среднее	1,7	29,4****	105,3	57,0****
Станд.откл.	20,8	34,1	50,2	40,5

Примечание: **** — $p < 0,0000\dots$; t -критерий Стьюдента.

Токсичность биологических жидкостей для сперматозоидов быка обратно пропорциональна индексу токсичности [4]. Высокие значения ИТК у пациентов свидетельствуют о снижении активности гуморальной защитной системы организма, одним из компонентов которой является комплемент сыворотки крови. Комплемент играет важную роль как в защите от инфекций, так и в патогенезе иммунных заболеваний и имеет большое значение для диссоциации и дальнейшей переработки иммунных комплексов. Данные литературы подтверждают факт активации каскада комплемента по классическому или альтернативному пути при различных типах аллергических заболеваний как в клинике, так и в условиях эксперимента [2, 10]. Снижение ИТК свидетельствует о возможном формировании у пациента состояния вторичного иммунодефицита [4].

Взаимодействие белков комплемента с антигенами приводит, с одной стороны, к образованию в крови крупных иммунных комплексов, с другой стороны, — к деградации патогенных агентов до молекул малой молекулярной массы, которые выводятся почками с мочой. Сбалансированность работы иммунной и выделительной систем определяет саногенетический статус организма. В норме скорости образования и утилизации продуктов обмена веществ находятся в состоянии динамического равновесия. В случае патологической гиперактивности иммунной системы выделительная система не справляется со своей функцией, и токсичные метаболиты накапливаются в моче, изменяя ее свойства. Несмотря на отсутствие признаков поражения почечной паренхимы в клиническом анализе мочи (реакция среды, белок, эритроциты, цилиндры и др.), она становится цитотоксичной по отношению к биологическим объектам.

Гипотеза о роли эндогенной интоксикации организма в механизмах патогенеза различных аллергических заболеваний, таких как бронхиальная астма, сезонный поллиноз, круглогодичный аллергический ринит, синдром хронической усталости, атопический дерматит и т.д. в настоящее время широко обсуждается в литературе [8]. Универсальным маркером ЭИ при различных патологических состояниях большинство исследователей считает уровень молекул средней массы [7]. Это, в свою очередь, диктует необходимость разработки новых методических подходов к определению размеров частиц биологических жидкостей.

Метод ЛКС позволяет оценить вклад в светорассеяние частиц различного гидродинамического радиуса для биологических жидкостей, в том числе для сыворотки крови и мочи. На основании данных, полученных при исследовании здоровых людей (без верифицированного диагноза), были построены усредненные гистограммы распределения светорассеивающих частиц по размерам для крови и мочи — «нормальные» спектры (рис. 1). Анализ аналогичных гистограмм пациентов с аллергическими заболеваниями показал, что в образцах мочи больных преобладают, по сравнению с «нормальными» спектрами, крупные частицы размером 221—1500 (III зона). Такое изменение спектральных показателей, согласно семиотическому классификатору, определяется как «аллергоподобные сдвиги» [1]. В ЛК-спектрах сыворотки крови увеличивается вклад в светорассеяние частиц малого размера, что свидетельствует об усилении процессов деградации молекул, характерных для состояний, сопровождающихся интоксикацией организма («интоксикационноподобные сдвиги»).

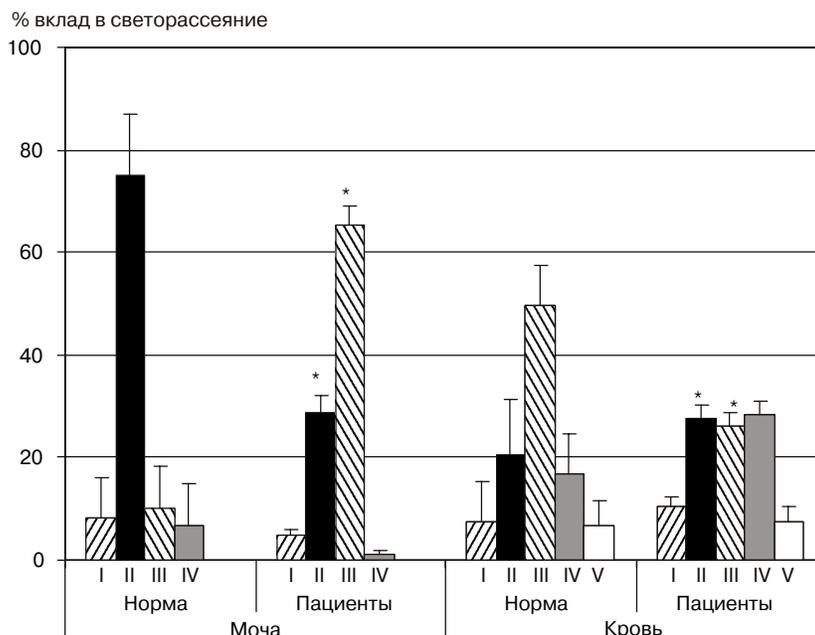


Рис. 1. Усредненные гистограммы ЛК-спектров мочи и сыворотки крови здоровых людей и пациентов с аллергологическими заболеваниями.

По оси абсцисс — гидродинамические радиусы частиц (нм) для мочи и сыворотки крови: для образцов мочи I — менее 75 нм; II — 76—220 нм; III — 221—1500 нм; IV — более 1500 нм; для сыворотки крови I — 0—10 нм; II — 11—30 нм; III — 31—70 нм; IV — 71—150 нм; V — 150 и выше.

По оси ординат — вклад частиц в светорассеяние (%).

* — $p < 0,05$, критерий Манна-Уитни

На основании этих наблюдений можно предположить наличие у значительной части пациентов с аллергическими заболеваниями синдрома ЭИ в различных стадиях развития. Индексы токсичности крови и мочи могут отражать степень тяжести заболевания. В соответствии со значениями ИТК и ИТМ выделили три группы пациентов и провели ЛК-исследование образцов сыворотки крови и мочи. Первую группу составили лица с ИТК ≤ 15 , ИТМ < 20 (группа 1; $n = 19$); вторую — пациенты с ИТК ≤ 15 , ИТМ ≥ 20 (группа 2; $n = 29$); третью — с ИТК > 15 (группа 3; $n = 17$).

Для ЛК-спектров мочи характерно сходное распределение частиц по размерам во всех группах: максимальный вклад в светорассеяние вносят частицы размером 220—1500 нм. Анализ ЛК-спектров сыворотки крови выявил значимые отличия в распределении светорассеивающих частиц в трех обследованных подгруппах (рис. 2). В группе 1 максимальный вклад в светорассеяние вносят частицы IV зоны (71—100 нм). В группе 2 и группе 3 доля частиц IV зоны снижена, а II зоны (11—30 нм) увеличена по сравнению с группой 1 ($p < 0,05$; критерий Манна-Уитни). По характеру распределения светорассеивающих частиц можно предположить, что в группе 1 преобладают «анаболические сдвиги» сывороточного гомеостаза. Как известно, при аллергических нарушениях происходит активация Th2-клеток и повышена продукция цитокинов и синтез Ig E [9]. Следовательно, с иммунологических позиций аллергический процесс на начальных этапах заболевания сопровождается появлением в крови крупных молекулярных

комплексов. В группе 1 и группе 2 нарастают «катаболические» метаболические изменения, обусловленные деструктивными процессами в тканях организма и вызывающие дисфункцию иммунной системы.

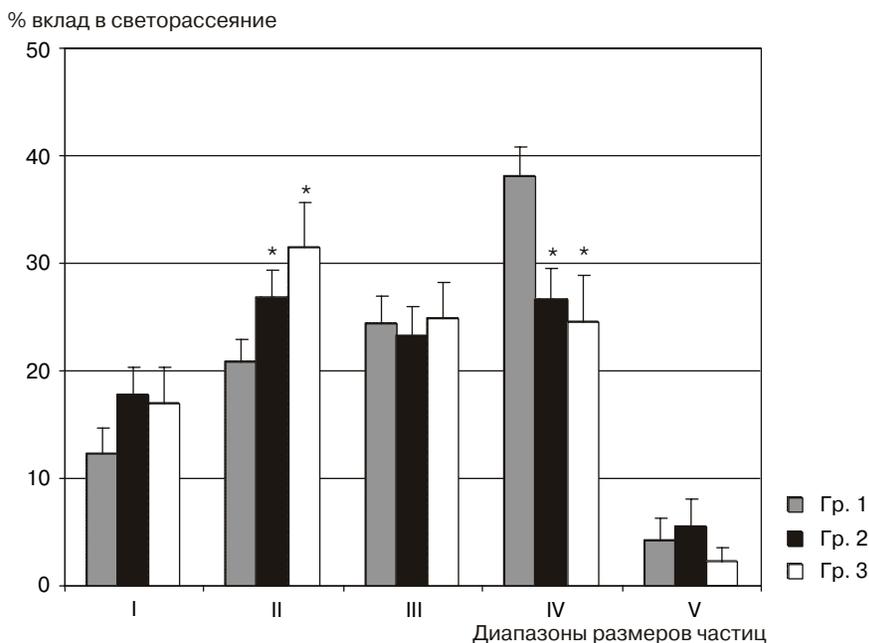


Рис. 2. Распределение светорассеивающих частиц в образцах сыворотки крови пациентов с различной степенью нарушений в состоянии защитных систем организма (пояснения в тексте).

Обозначения как на предыдущем рисунке.

* — $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни) отличия от группы 1

Пациенты с «анаболическим» и «катаболическим» типом сдвигов составляют в группе 1 50% и 20% соответственно; в группе 2 — 19% и 50%; в группе 3 — 12% и 62% (рис. 3). Таким образом, доля больных с эндогенной интоксикацией значимо выше в группе 2 и группе 3 по сравнению с группой 1 ($p < 0,05$; двусторонний критерий Фишера). В ряде работ отмечается, что тяжесть эндотоксикоза и выраженность иммунодефицита не только неразрывно связаны, но и взаимобусловлены [3].

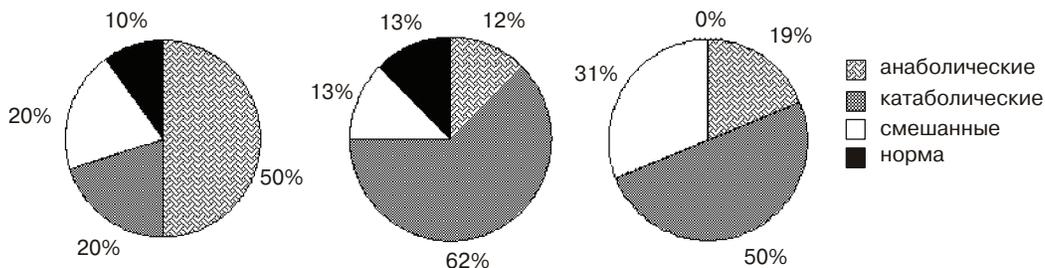


Рис. 3. Частота встречаемости различных типов ЛК-спектров в группах пациентов с различной степенью нарушений в состоянии защитных систем организма.

Пояснения в тексте

В ходе лечения состояние пациентов ($n = 22$) контролировали с помощью неинвазивного метода определения индекса токсичности мочи. ИТМ измеряли при первичном обследовании и после применения выбранной схемы лечения. Повторное измерение выявило снижение токсичности мочи у больных в 3,3 раза по сравнению с исходным уровнем, что свидетельствует о нормализации функции защитных систем организма. У части пациентов ($n = 7$) измерения ИТМ проводили трижды. В динамике обследования обнаружено, что токсичность мочи снижается неравномерно по сравнению с предыдущим уровнем: в первый месяц лечения токсичность уменьшилась в среднем в 14,5 раз, в течение последующих двух месяцев токсичность снизилась в 1,8 раза. Клинические показатели в эти сроки подтверждают, что в 100% случаев имела место значительная положительная динамика состояния здоровья пациентов.

Таким образом, использование двух указанных методов может оказаться полезным для уточнения диагноза и прогноза терапии аллергических заболеваний. Динамика этих показателей в ходе терапевтического воздействия связана, по-видимому, с изменением функционального состояния гуморальной иммунной системы и системы выделения большого и может служить мерой эффективности лечения.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Бажора Ю.И., Носкин Л.А. Лазерная корреляционная спектроскопия в медицине. — Одесса: Друк, 2002.
- [2] Васнева Ж.П., Балмасова И.П. Особенности состояния систем общего и специфического иммунитета у пациентов с лекарственной непереносимостью // Аллергология и иммунология. — 2003. — 1. — С. 41—47.
- [3] Гири А.О., Долгих В.Т., Мальков О.А., Лукач В.Н. Иммунореактивность у больных сахарным диабетом с разлитым гнойным перитонитом // Бюлл. СО РАМН. — 2006. — 1. — С. 27—34.
- [4] Еськов А.П., Каюмов Р.И., Леви М.И. и др. Новый метод определения активности комплемента и его клиническое значение // Клиническая лабораторная диагностика. — 2002. — 1. — С. 50—52.
- [5] Зайков С.В. Диагностика и лечение аллергических заболеваний — актуальная задача медицины // Актуальная тема. — 2005. — 11—12. — С. 10.
- [6] Ковалева О.И., Ковалева Л.Г., Горбунова Н.А., Карганов М.Ю. — Новые возможности ранней диагностики заболеваний системы крови // Гематология и трансфузиология. — 2004. — 49, 4. — С. 7—13.
- [7] Сыромятникова Е.Д. Лабораторная оценка уровня эндогенной интоксикации при остром панкреатите // Клиническая лабораторная диагностика. — 2000. — 10. — С. 15—16.
- [8] Buchwald D. // Post-viral Fatigue Syndrom. Edited by R. Jenkins and J. Mowbray. — 1991. — P. 117 — 136.
- [9] Kapsenberg M.L., Hikens C.M., Wierenga E.A., Kalinski P. The role of antigen-presenting cells in the regulation of allergen-specific T cell responses // Curr. Opin. Immunol. — 1998. — 10. — P. 607—613.
- [10] Wills-Karp M. Complement Activation Pathways A Bridge between Innate and Adaptive Immune Responses in Asthma // Proc. Am. Thorac. Soc. — 2007. — 4. — P. 247—251.

NEW METHODS FOR LABORATORY DIAGNOSTICS AND CONTROL OF EFFICIENCY OF THERAPY OF ALLERGIC DISEASES

O.A. Ezova

Asthma and immunology clinic
Marshala Golovanova, 1, Moscow, Russia

**N.N. Kylebnikova, I.B. Alchinova,
E.N. Arhipova, M.Yu. Karganov**

Lab. of polysystemic investigations
Institute of General Pathology and Pathophysiology RAMS
Baltyiskaya str., 8, Moscow, Russia, 125315

V.I. Torshin

Peoples Friendship University of Russia
Miklukho-Maklaya str., 8, Moscow, Russia, 117198

Laser correlation spectroscopy (LCS) and analysis of toxicity of patient serum and urine for bovine spermatozoa (AT), new methods for laboratory diagnostics and control of the efficiency of prescribed treatment, were first used in allergological clinical practice. These methods enable screening etiological diagnostics of allergic diseases and evaluation of the severity of the pathological process and state of defense systems of the organism during treatment. Adequate diagnostics makes it possible to realize individual choice of treatment protocol, due to which long-term remission can be expected.

We examined 250 patients (mean age $34,4 \pm 2$ years) with documented allergic disease of medium severity and 145 healthy individuals (mean age $38,1 \pm 1$ years). Significant differences were revealed in the functional state of the defense systems in these groups. It was found that endogenous intoxication develops in the majority of patients; it is characterized by reduced index of blood toxicity (IBT) and elevated index of urine toxicity (IUT) as well as increased contribution of small particles of blood serum into light scatter.

During therapy we observed a decrease in IUT, which attested to correction of the state of humoral defense system of the organism. Alleviation of the pathological state was confirmed by clinical findings. Our results suggest that new methods are highly informative and safe and should be introduced into allergologist's practices.