

УДК 616.24-056.3-07

Ю. А. Матвиенко

ГУ «Национальный институт фтизиатрии и пульмонологии им. Ф. Г. Яновского НАМН Украины», г. Киев

Значение лабораторной диагностики для дифференциального подхода к установлению этиологии аллергических заболеваний в пульмонологии (часть 1)

Ключевые слова: аллергические заболевания, аллергены, аллерген-компоненты, медиаторы аллергической реакции.

Методы лабораторной диагностики аллергических заболеваний в пульмонологии

Установление этиологии аллергического заболевания, как известно, заключается в выявлении конкретных причин - аллергенов, вызывающих развитие симптомов болезни. Формулируя современное определение аллергена и сенсибилизации, можно сказать, что аллерген – сложное вещество, обладающее эпитопом, критической молекулярной массой, иммунный ответ на которое реализуется сенсибилизацией или аллергической реакцией; а сенсибилизация – специфическая измененная реактивность иммунной системы, обусловленная наличием аллерген-специфических антител и аллерген-специфических лимфоцитов, также появлением и ростом представительства рецепторов различной аффинности для связывания аллерген-специфических антител в органах и тканях [2, 6, 10, 18, 24].

Лабораторная диагностика аллергических заболеваний должна помочь клиницисту в установлении этиологии заболевания, его патогенетической характеристики, включая характер и степень нарушений иммунной и других систем организма. Поэтому основными задачами лабораторной диагностики аллергического заболевания являются:

- определение типа (типов) аллергической реакции, установление сенсибилизации к аллергенам (специфическая аллергодиагностика);
- выявление характера и степени иммунных нарушений (иммунодиагностика);
- характеристика патогенетических изменений, типичных для данного аллергического заболевания (клиническая лабораторная диагностика).

Этиологическая диагностика включает в себя выявление не только сенсибилизации к отдельным аллергенам, типа (типов) аллергической реакции, но, главным образом,

установление их роли в развитии данного аллергического заболевания. Использование специфических методов лабораторной диагностики аллергии показано:

- для подтверждения наличия сенсибилизации;
- для выявления скрытой (субклинической) сенсибилизации;
- при наличии противопоказаний к проведению кожных проб (обострение основного заболевания; в период развития острых инфекционных, нервных и психических заболеваний; в случае возникновения декомпенсированных состояний болезней сердца, печени, почек и системы крови; вскоре после острой аллергической реакции; в период лечения гормонами);
- в случаях необходимости дифференциальной диагностики положительных/ложноположительных или отрицательных/ложноотрицательных результатов, полученных при кожном тестировании [2, 7, 9, 17, 20, 24].

Принципы лабораторной диагностики аллергических заболеваний

Диагностика аллергического заболевания включает 2 этапа: клинический и лабораторный. Прежде чем определить конкретный лабораторный метод специфической аллергологической диагностики, необходимо выявить особенности иммунологического механизма реализации аллергической реакции у пациента. Для этой цели врач-аллерголог анализирует анамнез, клинические проявления заболевания в прошлом и настоящем с целью определения круга предполагаемых аллергенов и типа иммунологической реакции. Выявляя клинические симптомы или синдромы, он относит их к определенному типу аллергических реакций, участники которой (например, специфический иммуноглобулин E – sIgE при аллергических реакциях 1-го типа), должны быть установлены лабораторными методами [1, 11, 14, 15, 24].

Существующие лабораторные методы выявляют только состояние сенсibilизации, т.е. свидетельствуют об измененной реакции иммунной системы больного на конкретный аллерген. Поскольку они характеризуют только иммунные нарушения, а не реакцию всего организма, результаты лабораторной диагностики не могут служить единственным доказательством того, что именно данный аллерген является этиологическим агентом аллергического заболевания. Поэтому в тандеме клиницист-лаборант специалистом, определяющим объем и необходимость определенных методов исследования, является клиницист, который определяет стратегию диагностики.

При планировании лабораторной диагностики и необходимости каких-то специфических методов исследования необходимо учитывать различия в иммунологических механизмах и участниках различных типов аллергических реакций, так как большинство лабораторных методов дает информацию лишь относительно конкретных участников иммунного реагирования (например, выявлять специфические антитела классов IgG или IgM при аллергических реакциях 2-го типа, а также сенсibilизированные лимфоциты при аллергических реакциях 4-го типа). Таким образом, предположение о патогенетических механизмах аллергического заболевания может оказать влияние на выбор определенных методов исследования, диктует необходимость применения адекватных патогенезу методов.

Иммунологические тесты в алергодиагностике условно могут быть разделены на 2 большие группы:

- неспецифические (направленные на выявление общих изменений иммунной системы при аллергии);
- специфические (выявление участвующих в иммунологической фазе аллергической реакции антител и клеток).

При дифференциальной диагностике аллергических и неаллергических (псевдоаллергических) заболеваний необходимо выяснение участия иммунологических механизмов (иммунопатогенеза) в их реализации. Известно, что аллергические и псевдоаллергические процессы различаются, главным образом, наличием (при аллергии) или отсутствием (при псевдоаллергии) иммунологической (первой) фазы аллергической реакции. С этой целью используются методы изучения иммунопатогенеза аллергии, определяющие возможных участников иммунологической фазы, например, определение специфических антител IgE класса при реакциях 1-го типа или сенсibilизированных лимфоцитов при реакциях 4-го типа. Только отрицательный ответ таких исследований позволяет утверждать, что реакция или заболевание носит псевдоаллергический характер [12, 13, 18, 24, 28].

Итогом всего диагностического процесса является оценка данных лабораторных исследований с клинических позиций — клиничко-иммунологическая трактовка результатов лабораторных исследований.

Для оценки изменений иммунной системы требуются специальные (иммунологические) лабораторные методы. Распознавание аллергена и последующая аллергическая

реакция вызывают активацию иммунной системы. Для выявления степени такой активации проводятся лабораторные исследования, позволяющие оценить изменения морфологии и функций различных звеньев иммунной системы. С этой целью используют тесты для определения субпопуляций Т- и В-лимфоцитов, уровня Ig, компонента, циркулирующих иммунных комплексов, медиаторов аллергического воспаления и цитокинов, в большей степени участвующих в иммунном ответе на аллергены: интерлейкин-4 (IL-4) — активация продукции IgE, IL-10, IL-5, гамма-интерферона и других. Через 6–18 часов после реакции с аллергеном на сенсibilизированных лимфоцитах усиливается экспрессия рецепторов к IL-2, уровень которой можно оценить с помощью моноклональных антител к CD25-антигену. С этой же целью можно определять наличие на лимфоцитах других молекул активации — CD69, CD71. Известно, что при стимуляции лимфоцитов аллергенами усиливается выделение IL-5, IL-4, гамма-интерферона, но не IL-2 и фактора некроза опухолей α (ФНО α). Аллергические заболевания могут сопровождаться изменениями картины периферической крови и белковых фракций. Часто наблюдаются лимфоцитоз, возрастание содержания белковых фракций, снижение уровня тромбоцитов и альбуминов. Кроме этого, может происходить повышение скорости оседания эритроцитов (СОЭ), содержания лейкоцитов и эозинофилов.

Типичные изменения иммунной системы, которые возникают при аллергических реакциях и заболеваниях:

- снижение абсолютного и относительного уровня Т-клеток (фенотип CD3+, CD8+);
- изменение количества Т-хелперов (фенотип CD3+, CD4+);
- повышение уровня активированных Т-лимфоцитов (HLA-DR+, CD25+);
- изменение уровня цитокинов — повышение концентрации IL-4 и IL-5, снижение содержания гамма-интерферона;
- повышение уровней IgG, IgM, общего IgE;
- снижение фагоцитарной активности нейтрофильных гранулоцитов;
- повышение уровня катионного белка эозинофилов (измерение уровня эозинофильного катионного белка является эффективной оценкой степени эозинофильного воспаления);
- повышение уровня циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК), особенно мелких размеров.

Наиболее часто в клинической практике для проведения специфической алергодиагностики используют определение уровней общего и аллерген-специфического IgE (аллергические реакции 1-го типа) [16, 24, 26, 33, 36].

IgE общий

IgE — один из пяти классов иммуноглобулинов, обнаруженных в сыворотке крови человека. Повышенные уровни IgE связаны с гиперчувствительностью немедленного типа, т.е. такими заболеваниями, как аллергическая астма, аллергический ринит и атопия, а также

паразитарные инфекции. Измерение уровня IgE у детей младшего возраста может быть использовано для оценки роли IgE в этиологии atopических заболеваний и прогнозирования возможности аллергии в будущем. Для определения уровня общего IgE чаще всего используют иммуноферментный метод (ИФА) [3, 14, 18, 24, 31, 48].

Особенности интерпретации исследований общего IgE

• Повышение уровня общего IgE может быть вызвано не только atopией, а целым рядом других заболеваний, в том числе:

- наличие скрытых вирусных или паразитарных инфекций (наиболее распространенный вариант — глистная инвазия);
- некоторые формы иммунодефицита, в частности синдром Жоба и бронхопальмональный аспергиллез, а также изолированный дефицит секреторной формы IgA;
- IgE-миелома (неоплазия IgE-продуцирующих клеток), тимусная аплазия (синдром Ди Джорджи), синдром Вискотт—Олдриджа и др.

• Нормальный уровень общего IgE в сыворотке крови не отрицает наличия сенсibilизации, до 30 % больных atopией имеют «нормальный» уровень общего IgE, и это может объясняться целым рядом причин, бронхопальмональным аспергиллезом и др.

• При сенсibilизации к одному (нескольким) аллергенам содержание общего IgE может быть в пределах нормы, а специфического IgE — повышено.

• Концентрация общего IgE в сыворотке крови может быть в пределах нормы при неatopических состояниях неиммунной природы, хронической рецидивирующей крапивнице и ангионевротическом отеке.

• Верхняя граница нормы общего IgE (100 кЕ/л) у представителей зон, эндемичных по гельминтозам, может быть выше обычной.

• Обнаружение аллерген-специфического IgE (к какому-либо аллергену или антигену) выявляет только сенсibilизацию и еще не доказывает, что именно этот аллерген является причиной аллергического заболевания [2, 7, 9, 14, 15, 18, 19, 33, 48].

IgE специфический

Методы определения специфических IgE многообразны: в настоящее время существует не просто несколько методов, а несколько принципиально различающихся подходов к определению специфического IgE (sIgE). Выбор конкретного подхода определяется как клинической задачей и декларированными преимуществами того или иного метода, так и некоторыми специфическими ограничениями, существующими для большинства из них.

Методы определения sIgE, в первую очередь, делятся на выполняемые *in vivo* и *in vitro*. Тесты *in vivo* имеют долгую историю, используются для определения сенсibilизации индивидуальными аллергенами и популярны по сей день, но, к сожалению, имеют целый ряд

не только аналитических, но и серьезных клинических ограничений. Тесты для определения специфических IgE *in vitro* разрабатываются с 1960-х годов, подход к *in vitro* диагностике sIgE несколько раз подвергался ключевым изменениям, что отражалось в понятии «новое поколение» *in vitro* тестов для sIgE. Остановимся на каждом методе в отдельности.

Традиционным способом *in vivo* определения сенсibilизации индивидуальными антигенами по сей день являются кожные пробы.

Кожная проба — физиологический тест, позволяющий обнаружить сенсibilизированные тучные клетки в коже человека. Классификация кожных проб проводится по методу введения провокационного материала в зону исследования:

- аппликационные (накожные, patch-тесты, эпикутантные);
- внутрикожные пробы;
- прик-тест;
- скарификационные.

Перечисленные выше типы кожных проб различаются между собой по аналитическим характеристикам и имеют разное клиничко-диагностическое предназначение. Так, внутрикожные пробы чаще применяются для выявления сенсibilизации к аллергенам бактериального и грибкового происхождения, а также для определения степени чувствительности к аллергенам неинфекционной природы; прик-тест чаще применяют для диагностики реактивного типа аллергических реакций, например, пищевой, лекарственной, пыльцевой аллергии. Patch-тесты чаще всего используют для выявления сенсibilизации на косметические средства и металлы

Основным преимуществом кожной пробы является наглядность получаемых результатов для пациента, относительно невысокая стоимость и возможность определения факторов хронической сенсibilизации организма в состоянии ремиссии аллергических заболеваний (АЗ), так как IgE-антитела, иммобилизованные на поверхности сенсibilизированных тучных клеток, способны функционировать более 10 недель.

Основным клиническим недостатком кожной пробы является риск повторной провокации острого приступа АЗ и/или сенсibilизации *de novo* при неправильном выборе провокационного антигена. Кроме того, большинство тестов *in vivo* показывают ложно заниженные результаты в случае, если пациент принимает антигистаминные препараты, поэтому при мониторинге эффективности лечения назначенную ранее терапию необходимо отменять как минимум за 3–5 дней до проведения теста.

Все без исключения методы *in vitro* определения, напротив, абсолютно безопасны для пациента, поскольку не требуют внесения в организм большого дополнительных количеств аллергенов. Кроме того, при определении аллерген-специфических антител *in vitro* возможно определение не только индивидуальных аллергенов, но и определение «панелей» — групп из нескольких родственных аллергенов, иммобилизованных на твердофазном

носителе. Подобный подход очень удобен при обследовании больных с многофакторными аллергическими заболеваниями. Он в значительной мере позволяет снизить количество шагов на пути от первоначального направления на анализ до получения точной картины заболевания. С одной стороны, это экономически выгодно, поскольку означает снижение общей стоимости исследования и его продолжительности. С другой стороны, «панельное» исследование дает возможность прогнозировать риск развития аллергических реакций при контакте с новыми аллергенами, гомологичными к уже имеющимся в списке пациента.

Однако существенным ограничением применения *in vitro* методов до последнего времени служил тот факт, что они направлены на регистрацию аллерген-специфических IgE-антител, циркулирующих в крови. Поскольку продолжительность жизни свободных IgE не превышает нескольких дней, наибольшая достоверность результатов *in vitro* исследований достигается при анализе проб, отобранных в острой фазе АЗ. В настоящее время существуют методы, направленные на регистрацию аллерген-специфических IgG, G4, A-антител, что существенно повышает шанс обнаружения «проблемных» аллергенов вне зависимости от времени обострения АЗ [11–13, 15, 18, 21, 24, 48].

Методы *in vitro* диагностики

Иммуноферментный анализ (сокращенно ИФА, *enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA*) – лабораторный иммунологический метод качественного или количественного определения различных соединений, в основе которого лежит специфическая реакция антиген-антитело. Выявление образовавшегося комплекса проводят с использованием фермента в качестве метки для регистрации сигнала. По причине разнообразия объектов исследования – от низкомолекулярных соединений до вирусов и бактерий, а также многообразия условий проведения ИФА существует большое количество вариантов этого метода [3, 6, 11, 13–15, 21].

Иммуноблоттинг (иммуноблот) – высокоспецифичный и высокочувствительный референтный метод, подтверждающий диагноз для пациентов с положительными или неопределенными результатами анализов, полученных в том числе при помощи РПГА или ИФА.

Этот метод выявления антител к отдельным антигенам основан на постановке ИФА на нитроцеллюлозных мембранах, на которые в виде отдельных полос нанесены специфические белки, разделенные гель-электрофорезом. В случае, если имеются антитела против определенных антигенов, – появляется темная линия в соответствующем локусе стрипа. Уникальность иммуноблота заключается в его высокой информативности и достоверности получаемых результатов. Используют наборы двух типов – вестерн-блот и лайн-блот [9, 11, 20–22]:

- *вестерн-блот*: наборы содержат тестовые стрипы-мембраны с электрофоретически разделенными нативными антигенами соответствующих аллергических агентов, таким образом антигены располагаются в порядке молекулярной массы. На мембраны могут быть также нанесены

1–2 дополнительные линии с клинически значимыми антигенами (вестерн-лайн блот). Это надежный подтверждающий метод, исключает ложноположительные ответы и перекрестные реакции;

- *лайн-блот*: в этом случае на тестовые стрип-мембраны нанесены только клинически значимые антигены (нативные, синтетические или рекомбинантные) в определенном порядке. Такой подход используется при дифференциальной диагностике нескольких аллергенов на одном стрипе.

Иммунохроматографический анализ (ИХА) – метод, основанный на разделении частиц методом парной связки и реакции между антигеном (аллергеном) и соответствующим ему антителом в биологических материалах (цельная кровь, сыворотка или плазма крови и т.п.). Данный вид анализа проводится с помощью специальных экспресс-тестов, тест-полосок или тест-кассет. В экспресс-тестах используются три типа антител:

- подвижные моноклональные антитела к исследуемому антигену или антителу, конъюгированные (сшитые) с коллоидным золотом – красителем, который можно легко идентифицировать даже в самых малых концентрациях. Эти антитела нанесены вблизи участка погружения тест-полоски в физиологическую жидкость;
- поликлональные антитела к исследуемому антигену или антителу, жестко иммобилизованные в тест-зоне полоски;
- вторичные антитела к моноклональным антителам, жестко иммобилизованные в контрольной зоне тест-полоски.

Взаимодействие (и окрашенная полоса) в контрольной зоне должны проявляться всегда, если анализ проведен правильно, независимо от присутствия исследуемого антигена в исследуемом субстрате [3, 9, 12].

Технология ImmunoCAP определения аллерген-специфических IgE. В основе метода лежит полностью автоматизированное иммуноферментное определение аллерген-специфических IgE с хемилюминесцентным способом регистрации результатов. Для этих целей используются оборудование и аллергены фирмы «Phadia», являющейся мировым лидером в данной области.

Идея технологии заключается в возможности обнаружения сверхнизких концентраций IgE-антител и других показателей в сверхмалом количестве крови пациента, которые указывают на определенную болезнь и/или состояние здоровья человека. Технически это реализуется путем использования специального вспененного материала, производного бромциан-активированной целлюлозы. Благодаря своей пористой структуре материал имеет большую поверхность взаимодействия и обеспечивает высокую связывающую способность с нанесенным на него антигеном или антителом. Поверхность взаимодействия такого материала в 150 раз больше внутренней поверхности обычной пробирки. Для использования в автоматических установках, хранения и маркирования этот материал помещают в миниатюрный специальный открытый пластмассовый колпачок – CAP. Колпачок сделан таким образом, что специальная система промывки позволяет за несколько

секунд получить полное отделение несвязанного вещества от пористого материала. Все вместе обеспечивает высокую точность исследований, воспроизводимость и быстроту выполнения.

Данная технология отвечает основным требованиям к проведению количественных анализов:

- связывающая способность — твердой фазой является трехмерная активированная целлюлозная губка, которая связывается с антителами по всему объему;
- позволяет тестировать наборы с большим количеством аллергенов (общие ингаляционная и пищевые панели), а для обычных наборов и индивидуальных аллергенов обеспечивает высокую точность;
- специфичность — не отмечено взаимодействие с другими иммуноглобулинами человека в физиологических концентрациях;
- чувствительность — в настоящее время пациент считается сенсibilизированным к аллергену, если концентрация антител к этому аллергену превышает 0,35 кЕ/л. Нижний предел детекции прибора составляет гораздо меньшие значения, например: перхоть кошки (e1) — 0,06 кЕ/л, молоко коровы (f2) — 0,05 кЕ/л, яичный белок (f1) — 0,08 кЕ/л, береза бородавчатая (t3) — менее 0,01 кЕ/л.

Необходимо также отметить, что все тесты выполняются в полностью регулируемой среде при стабильной температуре [8, 39–42].

Особенности интерпретации исследований специфических IgE

1. Отрицательный результат исследований на специфический IgE может быть обусловлен стратегией скрининга (отсутствовал тест на этот аллерген). Отсутствие специфического IgE в сыворотке периферической крови не исключает возможности участия в патогенезе IgE-зависимого механизма аллергической реакции, так как возможен местный синтез IgE, или связывания синтезированного IgE тканями, что может происходить без изменения концентрации специфического IgE в периферической крови.

2. Антитела других классов, особенно IgG (IgG4), специфичные к аллергену, в определенных случаях могут быть причиной ложноотрицательных результатов.

3. Высокий уровень аллергенспецифического IgE характеризует наличие высокого уровня сенсibilизации только по отношению к конкретному изучаемому аллергену.

4. При высоких концентрациях общего IgE чаще могут возникать ложноположительные результаты исследований на специфические IgE, так как в таких условиях повышается вероятность связывания неспецифических IgE с аллергеном.

5. Идентичные количественные результаты определения специфического IgE для разных аллергенов не означают их одинакового клинического значения.

6. Каждый основной аллерген (например, пыльца деревьев, пищевые аллергены или эпителий домашних животных) содержат большое количество различных аллергенных компонентов (протеинов). В этой связи

анализ должен выявлять антитела ко всем значимым компонентам, даже если они присутствуют в чрезвычайно ничтожных количествах в основном аллергене. Выделяют основные мажорные и минорные аллерген-компоненты.

Поэтому при подтверждении сенсibilизации пациента (sIgE > 0,35 кУ/л) необходимо провести аллерген-компонентный анализ для определения прогноза эффективности АСИТ (аллерген-специфическая иммунотерапия) согласно соответствующим алгоритмам, например, алгоритм прогноза эффективности АСИТ экстрактом пыльцы различных трав.

Диагностика реактивности к компонентам:

- главные аллерген-компоненты пыльцы: аллерген g213 (g205, g215) — rPhl p 1, rPhl p 5b;
- минорные перекрестно-реагирующие компоненты: аллерген g214 (g210, g212) — rPhl p 7, rPhl p 12 (таблица).

Прогноз эффективности АСИТ		
Высокая эффективность	Средняя эффективность	Низкая эффективность
rPhl p 1, 5 «+»	rPhl p 1, 5 «+»	rPhl p 1, 5 «-»
rPhl p 7, 12 «-»	rPhl p 7, 12 «+»	rPhl p 7, 12 «+/-»

После завершения курса АСИТ маркером эффективности терапии наряду с регрессией симптоматики является снижение уровня sIgE к соответствующему аллергену.

7. Окончательное заключение и интерпретация лабораторных данных должны быть сделаны специалистом-аллергологом на основании сопоставления результатов лабораторных исследований с клинической картиной и данными аллергологического анамнеза.

Для диагностики проблемных аллергенов существуют и другие методы исследования [3, 6, 8, 25, 29, 39–42, 47, 49, 50–54].

Тест антигенной стимуляции базофилов (CAST® Cellular Antigen Stimulation Test)

Тест предназначен для оценки активации базофилов аллергенами *in vitro*, иммуноферментным методом BU HLMANN CAST® (2000, ELISA) и методом проточной цитометрии, предназначен для количественного определения сульфидолейкотриенов (sLT), продуцируемых выделенными лейкоцитами при контакте со специфическими антигенами. Разница в концентрации sLT в образце, стимулированном аллергеном, по сравнению с фоновым образцом (стимулированным только буфером) показывает возможности базофилов пациента. Тестирование методом CAST® можно проводить при следующих клинических состояниях:

Немедленные патологические реакции на лекарства и химические вещества могут быть вызваны *in vivo* как IgE, так и не-IgE опосредованной (так называемые псевдоаллергические реакции) стимуляцией эффекторных клеток (например, базофилов, тучных клеток и эозинофилов). Метод CAST® можно рассматривать как модель

происходящих событий, при которых лейкоциты пациента стимулируют *in vitro*. Однако поскольку в методе CAST® используются чистые аллергены, в определенной буферной системе, без компонентов плазмы (например, факторов свертывания или комплемента), метод можно рассматривать только как упрощенную модель ситуации, возникающей *in vivo*.

Метод CAST® оптимизирован для определения только немедленного типа аллергических реакций (1-й тип) и псевдоаллергических реакций. Метод CAST® не предназначен для выявления аллергических реакций замедленного типа (например, 4-й тип реакций).

Таким образом, он должен быть использован только для диагностики немедленного типа аллергических реакций, в частности, со следующими клиническими симптомами: анафилактическая и анафилактоидная реакции; риноконъюнктивит; бронхиальная астма; крапивница/ангионевротический отек [3, 4, 20, 41].

Специфический IgG4-тест — позволяет определить антиген-специфические IgG4 в сыворотке/плазме крови человека. Измерения специфических IgG/IgG4 антител используют в клинических исследованиях не только различных аллергических заболеваний (астмы, ринитов, крапивницы, экземы и желудочно-кишечных расстройств), но и при заболеваниях легких, например, аллергическом альвеолите, аспергилломе и аспергиллезе. В процессе контроля иммунотерапии с использованием ингаляционных препаратов и ядов перепончатокрылых, как правило, наблюдают повышение уровня конкретных IgG и/или IgG4. Считается, что IgG и IgG4 антитела — биомаркеры антигенной сенсибилизации.

Определяется методами ИФА, иммунохроматографии [3, 4, 20].

Специфический IgG-тест — позволяет определить в сыворотке и плазме человека антиген-специфические антитела — иммуноглобулины класса G. Данные антитела составляют часть естественной системы иммунной защиты организма и развиваются в крови в ответ на контакт с инородными веществами, пищевыми продуктами. При аутоиммунных нарушениях антитела направлены против собственных антигенов (аутоантигенов). Определяется методом ИФА [3, 4, 20].

Специфический IgA-тест — позволяет определить антиген-специфические IgA, являющиеся частью естественной иммунной системы защиты организма, в сыворотке/плазме крови человека. Они присутствуют в слюне, на слизистой оболочке, а также в крови. Уровни специфического IgA могут возрастать при ответе иммунной системы на пищевые аллергены. Определяется методом ИФА [3, 4, 20].

ЕСР-тест позволяет определить уровень эозинофильного катионный белка в сыворотке. ЕСР — это высокотоксичный протеин, находящийся в гранулах эозинофилов. Эозинофилы, главным образом, ответственны за показатели воспалительного процесса при астме. По мере их активации в дыхательных путях происходит дегрануляция, приводящая к повреждению и десквамации эпителия дыхательных путей, что может вызывать гиперчувствительность и обострение воспалительного

процесса в дыхательных путях. ЕСР освобождается из активированных эозинофилов в ходе воспалительного процесса при астме. Определяется методом ИФА и иммунофлюоресценции [3, 4, 11, 20, 35].

β-Триптаза, хранящаяся внутри гранул, высвобождается только при активации тучных клеток. Измеряют общий уровень α- и β- триптазы в сыворотке или плазме крови. Временное повышение уровня служит клиническим маркером, подтверждающим тяжелые реакции, такие как анафилаксия. Увеличение базального уровня служит маркером риска для некоторых сенсибилизированных пациентов, с риском развития анафилактических реакций, например, после укуса пчел/ос или введения лекарств. Патологический уровень триптазы отражают возросшую нагрузку на тучные клетки при ряде гематологических заболеваний.

Перед проведением АСИТ (ЯИТ) обязательно нужно оценить общую неспецифическую реактивность пациента по уровню триптазы во избежание острых реакций. При уровне триптазы крови > 10 µg/l — высокая вероятность развития острых реакций при АСИТ, при уровне триптазы крови ≤ 10 µg/l — низкая вероятность развития острых реакций при АСИТ.

Дополнительными методами исследования аллергических реакций также могут служить методы определения медиаторов аллергических реакций. Имеется два основных класса химических медиаторов, ответственных за реакции гиперчувствительности немедленного типа. Первичные медиаторы являются молекулами, которые уже накоплены в гранулах тучных клеток и базофилах и начинают секретироваться в экстрацеллюлярную среду сразу после контакта клетки с антигеном. Гистамин среди этих субстанций играет наиболее важную роль в развитии аллергических реакций. Вторичные медиаторы являются молекулами, синтезируемыми после контакта тучных клеток, базофилов или других клеток воспаления с антигеном. В основном, вторичные медиаторы представляют собой метаболиты арахидоновой кислоты — эйкозаноиды. Арахидоновая кислота образуется из мембранных фосфолипидов как прямой продукт проявления активности фосфолипазы А или косвенный продукт превращений, опосредованных фосфолипазой С. Это происходит при активации различных типов клеток, особенно тех, которые участвуют в развитии воспаления, в частности аллергического: эндотелиальных и тучных клеток, базофилов, моноцитов и макрофагов. Метаболиты арахидоновой кислоты подразделяются на два класса: продукты липоксигеназы — лейкотриены и продукты циклооксигеназы — простагландины, тромбоксаны и простациклин. Основные методы исследования — иммуноферментный анализ и проточная цитометрия [3, 4, 20].

Медиаторы, действующие на сосуды и гладкие мышцы

Гистамин. Поскольку процесс дегрануляции тучных клеток происходит быстро, гистамин и сопутствующие факторы очень рано появляются в очаге аллергического воспаления, причем сразу в достаточно больших концентрациях,

чтобы вызвать ранние проявления гиперчувствительности немедленного типа. Они столь же быстро метаболизируются (95 % за 1 минуту), уступая место эйкозаноидам, которые образуются клетками *de novo* под действием тех же стимулов. Гистамин действует преимущественно на гладкие мышцы и эндотелий сосудов, связываясь с их H1-рецепторами. Стимуляция H1-рецепторов вызывает сужение бронхов, коронарных и легочных сосудов, а также повышение проницаемости капилляров. Указанные эффекты частично связаны с образованием в клетках окиси азота и простаглицлина. Через H2-рецептор гистамин действует на сердце, секреторные клетки желудка, подавляет пролиферацию и цитотоксическую активность лимфоцитов, секрецию ими цитокинов.

Серотонин образуется из 5-гидрокситриптофана под действием неспецифической карбоксилазы и хранится в тромбоцитах и энтерохромафинных клетках пищеварительного тракта. Тучные клетки и базофилы человека и многих животных (кроме кролика) практически не содержат серотонина. Его влияние на сокращение гладких мышц и проницаемость сосудов подобно действию гистамина, но не столь сильное. Серотонин принимает участие в реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), ускоряя миграцию sensibilizированных лейкоцитов через эндотелий сосудов. Кроме того, серотонин увеличивает чувствительность мононуклеаров к различным факторам хемотаксиса путем повышения концентрации цАМФ. В присутствии серотонина стимулируется секреция Т-лимфоцитами лимфокинов – хемотаксических факторов для моноцитов. Серотонин способствует агрегации тромбоцитов.

Синтезируемые медиаторы

К ним относятся метаболиты арахидоновой кислоты. Они подразделяются на два класса:

- продукты липоксигеназы – лейкотриены;
- продукты циклоксигеназы – простагландины, тромбоксаны и простаглицлин.

Простагландины и лейкотриены во многих отношениях альтернативны по своим физиологическим эффектам, хотя и внутри этих групп существуют значительные различия в активности. Общим их свойством являются преобладание действия на сосудистую стенку и гладкие мышцы, а также хемотаксический эффект. Эти воздействия реализуются в результате взаимодействия эйкозаноидов со специфическими рецепторами на поверхности клеток.

Лейкотриены (LT) – очень сильные медиаторы, оказывающие действие уже в наномолярных концентрациях. Три лейкотриена LTC₄, LTD₄ и LTE₄ образуют медленно реагирующую субстанцию анафилаксии. Эти лейкотриены образуются и выделяются в среду в течение 5–10 минут после активации тучных клеток и базофилов.

Лейкотриен B₄ (LTB₄) оказывает слабое прямое влияние на гладкие мышцы, однако, стимулируя циклоксигенацию эндогенной арахидоновой кислоты и образование тромбоксана в воздухоносных путях, вызывает длительный бронхоспазм вследствие развития там отека, увеличения секреции слизи и притока нейтрофилов.

LTB₄ вызывает заметную обратимую адгезию лейкоцитов к эндотелию посткапиллярных венул.

Лейкотриен C₄ (LTC₄) синтезируется как тучными клетками, так и полиморфноядерными лейкоцитами. Он превалирует среди продуктов легочных тучных клеток, активированных комплексом «аллерген-IgE». Он является мощным бронхоконстриктором, влияя преимущественно на мелкие воздухоносные пути, снижает в 600–9500 раз по сравнению с гистамином максимальную скорость выдоха. LTC₄ присутствует в среде 3–5 минут, в течение которых он превращается в LTD₄; последний преобладает в последующие 15 минут, медленно превращаясь в LTE₄. Он повышает проницаемость капилляров и посткапиллярных венул, снижает растяжимость легких, вызывает преходящую легочную и системную гипертензию с последующим длительным периодом гипотензии, снижением сердечного выброса, гемоконцентрацией и лейкопенией.

Лейкотриен D₄ (LTD₄) также вызывает сильное сокращение гладких мышц бронхов, особенно мелких. Максимальный эффект наблюдается в период от 2 до 7 минут после образования лейкотриена. Он в 5900 раз сильнее гистамина в отношении способности сужать воздухоносные пути. Он вызывает также сужение сосудов легких, снижение растяжимости легких, повышение микроваскулярной проницаемости и сужение коронарных сосудов.

Лейкотриен E₄ (LTE₄) оказывают хемотаксическое действие, но более слабое, чем LTD₄. Лейкотриены этой группы являются медиаторами аллергических процессов, в частности медленной фазы бронхоспазма при бронхиальной астме.

Простагландины (PG) – метаболиты арахидоновой кислоты, образующиеся с участием циклоксигеназы. Являются мощными медиаторами воспалительной реакции. Их биологическая активность специфична по отношению к органам-мишеням. Кроме того, они могут вызвать бронхоспазм, гипертензию в системе легочной артерии и расширение периферических сосудов. Простагландины накапливаются в очаге воспаления позже таких агентов, как кинины и гистамин и несколько позже лейкотриенов (через 6–24 часа).

Простаглицлин D₂ (PGD₂) – основным источником PGD₂ являются тучные клетки. PGD₂ усиливает направленную миграцию полиморфноядерных лейкоцитов и тормозит высвобождение ферментов другими клетками. PGD₂ вызывает сужение бронхов, сопровождаемое значительным снижением бронхиальной проводимости, некоторое повышение проницаемости микрососудов.

Простаглицлин E₂ (PGE₂) синтезируется главным образом в тучных клетках и нейтрофилах. PGE₂ тормозит митогенез, выработку лимфокинов, цитотоксичность, продукцию антител и стимулирует дифференцировку лимфоцитов, активируя ненаправленную миграцию полиморфноядерных лейкоцитов. PGE₂ вызывает лихорадку, эритему и повышает проницаемость сосудов, подавляет вызванное антигеном высвобождение гистамина тучными клетками.

Простагландин F2α (PGF2α) синтезується макрофагами і тучними клітками, викликає звуження судин і незначительне звуження мікрососудів. Це сильний бронхоконстриктор, граючий важливу роль в патогенезі atopічної бронхіальної астми.

Тромбоксан В2 (TXB2) – неактивний TXB2 утворюється в результаті перетворення із тромбоксану А2 (TXA2), являючогося С 20-жирної кислотою. TXA2 – дуже нестійка молекула (період напіврозпаду – 30 секунд), яка викликає звуження судин і бронхів, агрегацію тромбоцитів з звільненням їх ферментів і інших активних факторів, сприяє митогенезу лімфоцитів.

Простагліцилін синтезується тучними клітками. Оказує антагоністичне вплив порівняно з TXA2: розширює судини і тим самим збільшує проникність мікроциркуляторного русла.

Брадікінін є основним представителем родини кінінів. Кініни – це низькомолекулярні пептиди, розширюють певні кровоносні судини і, можливо, звужують дрібнокалиброві дихальні шляхи. Кініни знижують тиск в мікроциркуляції, збільшують проникність судинної стінки, тим самим сприяючи формуванню набряку і міграції лейкоцитів. Крім того, вони викликають спазм гладких м'язів, посилюють синтез арахідонової кислоти і утворення ейкозаноїдів.

Секреторна фосфоліпаза А2 (PLA2) – група близьких за дією ферментів, які після активації каталізують гідроліз складноестеричної зв'язки в положенні 2 гліцерофосфоліпідів, при цьому утворюється вільна жирна кислота (СЖК) і лізофосфоліпід (ЛФ). PLA2 секретується в формі проферменту, і для її активації потрібен гідроліз специфічних пептидних зв'язків. Для прояву каталітичної активності PLA2 потрібна Ca^{2+} в мілімолярних концентраціях. Ці ферменти мають ключове значення в продукції провоспалительних медіаторів – арахідонової кислоти і ейкозаноїдів. Вивільнення арахідонової кислоти відбувається переважно через активацію PLA2, і фосфатидилхолін є первинним субстратом. PLA2 бере участь у багатьох фізіологічних процесах, включаючи імунні реакції, запалення, клітинну проліферацію, вазо- і бронхоконстрикцію.

Растворима форма CD23 (sCD23) – важливе місце в контролі секреції IgE віддає розчинній формі молекули CD23. Знаходячись на поверхні клітки, вона виконує роль низкоафінного рецептора. Цей С-лектиновий рецептор присутній на поверхні 30 % В-лімфоцитів і на 1 % Т-кліток і моноцитів (у хворих з алергією цей відсоток суттєво збільшується). Під впливом IL-4 CD23 починає продукуватися В-клітками і моноцитами в розчинній формі. sCD23 взаємодіє з рецепторним комплексом В-кліток, що містить CD19, 21. При цьому запускається сигнал до переключення ізотипів імуноглобулінів на IgE, до посилення проліферації В-кліток і секреції ними IgE. Він також стимулює широкий

спектр біологічних ефектів в інших типах кліток. Високі рівні sCD23 в сироватці крові виявлені при В-хронічній лимфолейкозії, після трансплантації кісткового мозку і при гіпер-IgE синдромі. Дуже високі рівні sCD23 в синовіальній рідині спостерігаються при ревматоїдному артриті [5, 9, 20, 32, 35].

Висновок: ще раз можна нагадати основні переваги методів імуноаналізу, застосованих в алергології:

- безпека для пацієнта;
- відсутність протипоказань;
- можливість проведення досліджень в будь-якому, в тому числі ранньому дитячому віці, в період загострення, при високій ступені сенсибілізації;
- виявлення реакції на велику кількість алергенів за одне дослідження;
- відсутність впливу зміненої реактивності шкіри;
- дослідження можливі на фоні лікування [18, 24].

ЗНАЧЕННЯ ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ ДЛЯ ДИФЕРЕНЦІАЛЬНОГО ПІДХОДУ ДО ВСТАНОВЛЕННЯ ЕТІОЛОГІЇ АЛЕРГІЧНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ В ПУЛЬМОНОЛОГІЇ (ЧАСТИНА 1)

Ю. О. Матвієнко

Резюме. Встановлення етіології алергічного захворювання полягає у виявленні конкретних причин – алергенів, що викликають розвиток симптомів хвороби. Лабораторна діагностика алергічних захворювань повинна допомогти клініцисту в встановленні етіології захворювання, його патогенетичної характеристики, включаючи характер і ступінь порушень імунної й інших систем організму. Основними алергологічними нозологіями в пульмонології вважаються захворювання алергічного походження з переважною поразкою бронхолегеневої системи. До них відносяться: бронхіальна астма, поліноз, алергічний бронхолегеневий аспергільоз, синдром Леффлера, синдром Стюарта–Зельцера–Анта, тропічна еозінофілія, вузловий поліартерит, екзогенний алергічний альвеоліт, синдром Хайнера.

Ключові слова: алергічні захворювання, алергени, алергокомпоненти, медіатори алергічної реакції.

THE VALUE OF LABORATORY DIAGNOSIS FOR THE DIFFERENTIAL APPROACH TO ESTABLISH THE ETIOLOGY OF ALLERGIC DISEASES IN PULMONOLOGY (PART 1)

Y. A. Matvienko

Summary. Establishing the etiology of allergic disease is to identify the specific causes – allergens that cause the development of symptoms. Laboratory diagnosis of allergic disease should assist the clinician in establishing the etiology of the disease, its pathogenic characteristics, including the nature and extent of immune disorders and other body systems. The main allergenic nosologies in pulmonology are considered a disease of allergic origin, mainly affecting the broncho-pulmonary system. These include: asthma, hay fever, allergic bronchopulmonary aspergillosis, a syndrome of Loeffler's, syndrome of Stewart–Seltzer–Anta, tropical eosinophilia, polyarteritis nodosa, exogenous allergic alveolitis, Heiner syndrome.

Key words: allergic diseases, allergen, the allergen components, mediators of allergic reaction.