

DOI: 10.14427/jipai.2016.4.25

Диагностика аллергии и гиперчувствительности: ведущее значение клеточных методов

П.Д. Новиков¹, Д.К. Новиков¹, Н.Д. Титова²¹ Витебский государственный медицинский университет, г. Витебск² Белорусская медицинская академия постдипломного образования, г. Минск

Diagnosis of the allergy and hypersensitivity: leading value of cell-like methods

P.D. Novikov¹, D.K. Novikov¹, N.D. Titova²¹ Vitebsk State Medical University, Vitebsk² Belarusian Medical Academy, Minsk

Аннотация

Дана оценка современных методов диагностики аллергии, которые могут обеспечить полную диагностику аллергических заболеваний, выявить тип и механизм гиперчувствительности, сенсibilизацию организма к причинно-значимому аллергену, с помощью специфического аллергологического обследования *in vivo* и *in vitro*. Показана роль современных клеточных методов, способных выявить аллергию и гиперчувствительность, возможность их применения в клиниках и лабораториях и их преимущество перед определением только IgE-антител.

Ключевые слова

Аллергия, IgE, IgG, антитела, базофилы, нейтрофилы, гранулоциты, Т-лимфоциты, цитокины, *in vitro*.

Парадоксы IgE-диагностики аллергии

Среди аллергологов и остальных врачей распространено мнение, что самый эффективный способ диагностики аллергии – определение в крови IgE-антител против аллергена. К сожалению, это не так. IgE-зависимость аллергии преувеличена. Во-первых, существуют и другие типы немедленной аллергии – иммунокомплексный, цитотоксический, зависимые от IgG-антител, во-вторых – замедленный Т-клеточный тип реакций [1, 2, 3, 4, 5, 6], которые не выявляются в IgE-анализе. Частота их встречаемости у больных не меньше, чем IgE-зависимой аллергии. Кроме того, IgE-антитела в сыворотке крови не обяза-

Summary

An assessment of the modern methods of diagnosis of an allergy, the level of development of the modern technologies in medicine which can provide the complete diagnosis of allergic diseases is given, reveal type and the mechanism of a hypersensitivity, an organism sensitization to causal significantly allergen, by means of specific allergological inspection of *in vivo*. The role of the modern cell-like methods capable to reveal of an allergy and hypersensitivity, a possibility of their application in clinics and laboratories is shown.

Keywords

Allergy, IgE, IgG, antibodies, basophiles, neutrophils, granulocytes, T-lymphocytes, cytokines, *in vitro* of diagnosis.

тельно «виновники» аллергии. Они могут быть ее причиной только если связаны с лейкоцитами крови (базофилами, эозинофилами и даже нейтрофилами – у «аллергиков»). Когда такие, связанные антитела, взаимодействуют с аллергенами, то из клеток выделяются медиаторы аллергии – гистамин и другие [1, 2, 4, 5]. Эти медиаторы и цитокины индуцируют воспаление в коже, слизистых оболочках бронхов, кишечника, носа и др., т.е. развитие аллергии. Циркулирующие в крови IgE – свободные молекулы, не вызывают реакций [6, 7, 8].

Отсюда вывод: **свободные IgE-антитела сыворотки крови не обязательно указывают на**

аллергию, а их отсутствие не отрицает ее наличие! Только IgE, связанные с клетками, – базофилами, эозинофилами и другими участвуют в аллергии.

Кроме того, в сыворотке крови больных могут быть IgG-антитела. Обычно их не определяют, потому что реже указывают на аллергию. Это реакции к белкам: антисывороткам, препаратам инсулина животного происхождения, инфекционным антигенам, некоторые варианты пищевой аллергии и др. По механизму такие реакции часто развиваются на иммунные комплексы и индуцируют васкулиты, однако IgG-антитела могут оказывать цитотоксический эффект на клетки после активации комплемента.

С другой стороны, IgG-антитела тоже связываются с любыми лейкоцитами, имеющими FcγRI рецепторы для него. Тогда при взаимодействии с аллергеном клетки, несущие их, тоже выделяют медиаторы и ферменты [2, 3, 5, 7].

Следовательно, для диагностики аллергии нужно определять IgG, не только свободные, но и, что важнее, – связанные с лейкоцитами.

Однако, существует еще **неспецифическая гиперчувствительность** (псевдоаллергия), которая отличается тем, что при ней **нет антител**, а лейкоциты непосредственно своими рецепторами («паттерн» или «образраспознающими» Toll) взаимодействуют с любыми патогенами – инфекционными, неинфекционными (лекарствами, пищевыми, бытовыми и др.), т.е. с теми же аллергенами и тоже выделяют медиаторы. У людей с такой гиперчувствительностью клинические реакции похожи на аллергию. Псевдоаллергия не определяется в тестах, выявляющих антитела.

Но проблема решаема. Разработаны **клеточные тесты**, которые позволяют выявлять аллергию как IgE, IgG-зависимую и Т-клеточную, так и неспецифическую гиперчувствительность [3, 4, 5, 9, 10].

Суть этих методов заключается в том, что лейкоциты крови инкубируют с предполагаемым аллергеном, а после инкубации определяют:

- их активацию по любым параметрам;
- изменение фенотипа клеток, т.е. их рецепторов (для базофилов это молекулы CD63+ CD203+ [11, 12, 13, 14], для Т-лимфоцитов – CD69+ и другие [3, 5, 13]) проточной цитометрией;
- для Т-лимфоцитов – реакция бласттрансформации и ингибиции лимфоцитов;
- выделение цитокинов [11, 12];

- для нейтрофилов – их повреждение, выделение миелопероксидазы и ионов калия в надосадочную жидкость [7, 14];
- для любых лейкоцитов – выделение ионов калия [9, 10, 15].

В этих тестах можно определять оба вида: истинную аллергию и неспецифическую гиперчувствительность на любой агент, в том числе на воздействие физических факторов.

Специфическое аллергологическое обследование

Существует два вида методов аллергенспецифического обследования: 1) провокационные тесты **in vivo**, проводимые на больном; 2) лабораторные методы **in vitro**.

Лабораторные методы **in vitro** имеют преимущество благодаря их безопасности и безвредности для больного. Важным предварительным этапом этого обследования служат **элиминация** аллергенов и **ремиссия** заболевания. Необходимость элиминации объясняется тем, что в условиях воздействия аллергенов система иммунитета организма постоянно «десенсибилизируется», поэтому провокационные тесты у больного и лабораторные методы могут давать искаженные, нередко отрицательные результаты. Исключать предполагаемые аллергены можно тогда, когда они становятся известными на основании данных анамнеза и предварительного клинического обследования. В острый период аллергического заболевания специфические методы (как провокационные **in vivo**, так и лабораторные **in vitro**) часто бывают отрицательными, а использование аллергенов при тестировании на больных может усилить обострение, поэтому специфическое обследование обычно проводят в период ремиссии. Лишь в особых ситуациях (при необходимости, например, введения лекарств по жизненным показаниям) иногда проводят специфическое обследование в острый период, причем, предпочтительнее сочетать лабораторные методы и щадящие тесты у больного для большей достоверности результатов [1, 4, 6, 7].

Из многих видов аллергенов выделены высокоочищенные фракции, а также получены рекомбинантные аллергены, что повышает чувствительность и специфичность коммерческих тест-систем. Однако часть больных реагирует на промежуточные и "минорные" аллергены, поэтому неочищенные или частично очищенные препараты выявляют более полную популяцию больных с гиперчувствительностью. Для диагностики **in vivo** и **in vitro** обычно используют водно-солевые экстракты аллергенов. Оптимальным

являются наборы диагностических аллергенов по определенному назначению: ингаляционные, для диагностики поллинозов, скрининговые и др. Важной проблемой является стандартизация аллергенов. Процесс этот сложен из-за гетерогенности их состава. В настоящее время, большинство коммерческих тест-систем для диагностики аллергии *in vitro* в основном представлены тест-системами, определяющими общий или специфический IgE, что является недостаточным, так как позволяет выявлять только IgE свободные (в крови) антитела без учета IgE-связанных с клетками и других типов аллергии [5, 7].

Среди иммунологических методов оценки неспецифических параметров иммунного статуса при большинстве атопических заболеваний часто определяют количество общего IgE. Однако по затратам, чувствительности и клинической значимости это определение уступает традиционным методам аллергодиагностики (кожные и провокационные тесты) и нередко его показатели не соответствуют клинической картине. Поэтому определение содержания общего IgE хотя и полезно при некоторых заболеваниях, но не имеет большого значения для диагностики аллергии. Уровень IgE в крови колеблется и зависит от возраста. Этот анализ рекомендуется использовать для исследования пуповинной крови новорожденных: увеличение уровня IgE выше 20 ЕД/мл указывает на возможность развития атопических заболеваний. Оценка у больных атопией уровня общего IgE в крови и секретах имеет определенное значение для диагностики аллергии: характерен подъем его в крови выше 100 МЕ/мл [5, 8]. Однако высокий уровень IgE может встречаться при глистных инвазиях и других заболеваниях, а нормальный – при аллергии.

Особенности интерпретации результатов диагностики *in vitro*, кожных и провокационных проб у больных с аллергией

При положительных анамнезе, кожных пробах (по данным ИФА и хемилюминесцентных тестов – выявление IgE-антител на аллергены наблюдается у 65-85% больных, отрицательные – у 17-35%, в зависимости от вида аллергена, фазы аллергической реакции, давности контакта больного с аллергеном. Наибольшее несовпадение результатов лабораторных тестов на IgE-антитела и кожных и провокационных проб отмечено на пищевые аллергены [6, 7].

При оценке уровня общего и специфического IgE в сыворотке крови необходимо учитывать

следующие особенности интерпретации полученных результатов [2, 8]:

- 30-45% больных (при разных видах аллергии) имеют уровень общего IgE не отличающийся от значений нормы, при этом кожные и провокационные тесты *in vivo* могут быть положительными и могут выявляться IgE-антитела;
- уровень общего IgE в сыворотке крови нередко повышен при других заболеваниях (гельминтозы, бронхолегочный аспергиллез, гипер-IgE-синдром, IgE-миелома, аутоиммунные заболевания и др.);
- нормальный уровень IgE в сыворотке крови отличается в различных популяциях населения, странах, территориях эндемичных по гельминтозам и пр.;
- уровень общего IgE может значительно отличаться при исследовании в динамике у одного и того же больного, так как IgE является самым короткоживущим иммуноглобулином (период полужизни в свободном состоянии – 2-3 суток [7, 8];
- на уровни общего и специфического IgE влияет проводимое медикаментозное и немедикаментозное лечение, элиминационные мероприятия, диета, физические и психо-эмоциональные воздействия и пр.;
- IgE-антитела часто присутствуют не только к одному причинно-значимому аллергену, ответственному за конкретные клинические симптомы, но и к другим аллергенам, поэтому диагноз аллергии должен ставиться в комплексе с анамнезом, клинической картиной, аллергологическим специфическим обследованием *in vivo*;
- одинаковый уровень IgE-антител к разным аллергенам не говорит об их одинаковом клиническом значении, так как разные аллергены отличаются по способности связывать IgE-антитела;
- отрицательный тест на IgE-антитела к какому-либо аллергену не исключает его значимости для клиники, так как возможно истощение уровня специфического IgE в острый период заболевания; фиксация его Fcε-рецепторами клеток системы иммунитета; развитие местной IgE-зависимой реакции, когда в кровь он не поступает; ложноотрицательный результат из-за высоких титров изотипоспецифических антител других классов (G, M, A);
- отрицательный результат на IgE-антитела часто наблюдается при развитии аллергии по другим - IgE-независимым механизмам

или при псевдоаллергии (неспецифической гиперчувствительности).

Методы выявления антител, связанных с лейкоцитами и сенсибилизации лимфоцитов, в настоящее время, недооценены и редко используются для диагностики из-за недостаточной стандартизации, унификации, невозможности длительного хранения клеток. Однако только с их помощью можно выявить все виды сенсибилизации к аллергену *in vitro* (т.е. гиперчувствительность), а не только свободные антитела.

При выявлении антител, связанных с лейкоцитами клеточными тестами, такими как, тест дегрануляции базофилов (ТДБ), реакция аллергенспецифического повреждения лейкоцитов (РАПЛ), реакция выброса миелопероксидазы (РВМ) и др., а также при оценке сенсибилизации лимфоцитов в реакции бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ), повышения экспрессии рецепторов активации, выделения Т-лимфоцитами цитокинов при стимуляции аллергеном, необходимо учитывать ряд факторов, негативно влияющих на результат теста, вследствие чего он может быть ложноотрицательным или ложноположительным. К ним относятся:

- наличие эозинофилии, лейкопении или лейкоцитоза у пациента;
- системная аллергическая реакция, наличие контакта с аллергеном (в том числе кожные и провокационные тесты *in vivo*, специфическая иммунотерапия) до или во время постановки теста, могут быть причиной отрицательного теста;
- медикаментозная терапия мембранстабилизирующими, антигистаминными и глюкокортикостероидными препаратами;
- развитие аллергии по местному механизму, когда сенсибилизированные клетки могут отсутствовать в кровотоке;
- некоторые аллергены, особенно лекарства, могут иметь только один эпитоп, а для запуска клеточной реакции необходимо, чтобы два IgE-антитела, находящиеся на клетке, связали аллерген;
- реакция сенсибилизированных лимфоцитов на аллерген зависит от его вида, поэтому спектр выделяемых клеткой цитокинов и экспрессируемых молекул активации может быть отличным от выбранного для диагностики.

Результаты диагностики аллергии с помощью кожных и провокационных тестов не всегда совпадает с данными анамнеза и клинической картиной. Ложноотрицательные кожные пробы на аллергены наблюдаются у 15-25% взрослых

больных БА и у 30-40% детей, а ложноположительные у 7-11% здоровых лиц и у 10-25% больных различными заболеваниями. При постановке кожных проб с аллергеном домашней пыли у больных ревматоидным артритом они были положительными у 20% больных [7]. Причинами этого явления, кроме неправильной техники постановки проб, могут быть:

- физиологические особенности кожных покровов и слизистых (пожилой или детский возраст, индивидуальные свойства кожи и пр.);
- период после аллергической реакции или острый период во время проведения пробы;
- медикаментозная терапия препаратами, тормозящими аллергические реакции - антигистаминными, мембраностабилизирующими, иммунодепрессантами, глюкокортикостероидами и др.;
- прием лекарств, пищевых продуктов, которые являются либераторами гистамина, лейкотриенов и других медиаторов аллергии;
- заболевания кожи различной этиологии и сильный кожный дермографизм;
- псевдоаллергические реакции.

Частой причиной из-за которой наблюдается расхождение данных аллергоанамнеза, клинической симптоматики и диагностики аллергии, *in vitro* и *in vivo*, являются перекрестные реакции на аллергены. Причем многие из них относятся к перекрестным реакциям между разными видами аллергенов. Это происходит из-за наличия в молекулах аллергенов гомологичных структур или эпитопов, что приводит к ложноположительным реакциям или пробам на аллерген с которым у пациента не было контакта ранее и/или к которому у него нет состояния аллергии. В качестве примера, один из аллергенов березы – профилин, есть в ольхе, орешнике, дубе, подсолнухе, сельдерее, яблоке, персике, дыне, груше, черешне, сое, арахисе, латексе, и др.; один из аллергенов клещей домашней пыли – тропомиозин, имеется в креветках, таракане, кальмаре и др. На эти общие эпитопы аллергенов имеются реакции у некоторых больных.

Диагноз аллергии к какому-либо конкретному аллергену должен основываться, с одной стороны на клинических данных и аллергоанамнезе, с другой - на результатах специфического аллергологического обследования *in vitro* и *in vivo*, и только комплекс методов обеспечивает точную диагностику. Для правильной оценки результатов лабораторной диагностики необходимо исследовать сыворотку крови, лейкоциты и слюну (или другие секреты) больного.

Клеточные методы иммунодиагностики аллергии

Применение методов диагностики аллергии фактически предусматривает оценку иммунного статуса больного. Однако при аллергии это один из вариантов иммунного статуса – «аллергический статус» и его характеристика должна включать прежде всего методы, выявляющие специфические реакции на аллергены. Общие, неспецифические методы количественной и функциональной характеристики Т- и В-лимфоцитов и даже их субпопуляций не имеют большого значения в аллергодиагностике. Они лишь в какой-то степени полезны для контроля лечения, а в основном применяются при необходимости дифференциальной диагностики, особенно при сочетании аллергии и иммунодефицитов. При этом на первый план нередко выступают дефициты местных факторов иммунитета. Примером может служить недостаточность

секреторного IgA в секретах слизистых оболочек, служащая одной из основных причин развития аллергических реакций в слизистых оболочках носа, бронхов и др. Определение в таких случаях даже неспецифического IgA в секретах является необходимым методом диагностики [5, 6].

Методы диагностики аллергии и их результаты зависят от типов аллергических реакций и ими определяются (табл. 1) [4].

Для иммунодиагностики аллергии *in vitro* в первую очередь применяются **специфические методы обследования**, направленные на:

- выявление свободных антител в сыворотке крови и секретах;
- обнаружение антител, связанных с лейкоцитами (базофилами, нейтрофилами, эозинофилами, тромбоцитами и др.);
- определение лимфоцитов, сенсibilизированных к аллергену.

В сыворотке крови больных обнаружены антитела различных классов, причем их титр

Таблица 1. Связь клиники и методов диагностики аллергии и псевдоаллергии с типами аллергических реакций

Тип реакции	Механизм	Клинические проявления	Диагностические тесты <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>
I. Анафилактический	Антитела IgE, IgG4	Шок, крапивница и др.	Определение IgE, IgG4 антител в сыворотке крови и фиксированных базофилами, определение триптазы в сыворотке крови. Кожные, подъязычные и другие тесты
II. Цитотоксический	Антитела IgG, IgM	Гематологические и др.	Определение IgG, IgM антител в сыворотке крови и связанных нейтрофилами, тромбоцитами, кожные тесты
III. Иммунокомплексный	Антитела IgG, IgM, иммунные комплексы	Сывороточная болезнь и сывороточноподобный синдром, васкулиты	То же и выявление иммунных комплексов Кожные и другие тесты (реакции через 6-8 часов)
IV. Замедленные реакции	Иммунные Т-лимфоциты	Контактный дерматит, повреждения органов	Выявление иммунных Т-лимфоцитов Замедленные кожные и другие тесты (реакция через 24-48 часов)
V. Смешанные	Антитела IgE, IgG и Т-лимфоциты	Различные комбинированные, фотосенсибилизация	Определение антител и иммунных Т-клеток Кожные и другие тесты
VI. Псевдоаллергия (неспецифическая гиперчувствительность)	Неспецифические (нет антител)	Любые	Оценка гиперчувствительности лейкоцитов к агентам-индукторам по маркерам активации, выделению ферментов и цитокинов, оценке маркеров альтернативного пути активации комплемента

зависит от периода аллергии. Наибольшее количество свободных антител в крови больного появляется через несколько дней после контакта с аллергеном. В острый период реакции титр антител обычно снижен, а при затихании обострения повышается. Большую роль в аллергодиагностике играют антитела класса IgE, выявляемые в высоком титре в сыворотке крови. Обнаружение антител класса IgG, IgM менее значимо, так как в невысоких титрах они встречаются к целому ряду аллергенов (особенно к бактериальным, пищевым и др.) даже у здоровых лиц. Однако нарастание уровня IgG и IgM антител в процессе лечения к соответствующему аллергену обязательно следует учитывать [5, 8].

Для выявления свободных антител выпускаются современные коммерческие тест-системы, с высокой диагностической чувствительностью и специфичностью, в основе которых лежит реакция антиген-антитело, где один из компонентов является меченым радиоактивной, ферментной, флуоресцентной меткой или коллоидным тяжелым металлом (методы РАСТ, ИФА, иммунофлуоресценции, иммунохемолуминисценции и др.). Главные проблемы диагностики с помощью таких высокочувствительных и специфичных тест-систем является их недостаточная клиническая эффективность: во-первых потому, что часть антител связана с клетками, причем наиболее аффинных, во-вторых - существует клеточно-зависимая специфическая и неспецифическая гиперчувствительность.

Методы выявления антител с помощью клеток

Непрямой тест дегрануляции базофилов (Шелли) и тучных клеток (Шварца) – распространенные методы выявления антител класса IgE. Принцип реакции заключается в том, что базофилы и тучные клетки способны связывать Fcε-фрагменты IgE-антител сыворотки крови больного своими FcεRI-рецепторами. Таким пассивным путем они сенсибилизируются к аллергенам, добавление которых вызывает дегрануляцию. Клетками-мишенями реакции служат лейкоциты крови кролика (псевдобазофилы), тучные клетки крыс или лейкоциты доноров. После инкубации в опыте и в контроле определяют процент дегранулированных (неокрашенных, с бесцветной периферией) базофилов. Учитывают также образование псевдоподий, деформацию клеток, усиленное движение гранул. Тест считается положительным, если в опыте их на 15% больше, а на 20% и более – резко положительным [2, 3, 6].

Непрямой метод выброса ионов калия из лейкоцитов используется для выявления антител в сыворотке крови. Лейкоциты здорового человека обрабатывают сывороткой больного с аллергией, и если в ней были антитела, то они связываются с лейкоцитами. Добавленный аллерген связывается с антителами и вызывает выброс калия. По приросту калия, оцениваемого на пламенном фотометре в надосадочной жидкости суспензии лейкоцитов, инкубированной с аллергенами, можно судить о наличии антител [3, 10].

Определение антител, связанных с лейкоцитами

В последнее время, в лабораторной диагностике аллергических заболеваний повышается интерес к разработке и использованию новых методов клеточной иммунодиагностики [7, 11, 12, 13].

На поверхности всех лейкоцитов имеются Fc-рецепторы, которые связывают через Fc-фрагменты иммуноглобулины различных классов, в том числе обладающие специфичностью антител. Поэтому, с одной стороны, лейкоциты с помощью этих антител могут специфично взаимодействовать с антигенами-аллергенами, с другой – концентрация антител в крови снижается и нередко из-за этого они не выявляются в сыворотке крови. Базофилы, тучные клетки, эозинофилы, имеют FcεRI-рецепторы, связывающие IgE, а нейтрофилы – Fcγ, фиксирующие IgG, кроме того, нейтрофилы больных аллергией также имеют FcεRI рецепторы, запускающие гранулоцит-опосредованные реакции гиперчувствительности [4, 7, 14]. На выявлении клеток, несущих IgE и IgG-антитела, основано несколько видов реакций.

Тесты активации базофилов

Базофилы имеют секреторные гранулы, содержащие гистамин и способны секретировать протеазы, цитокины, хемокины и липидные медиаторы. Активация базофилов происходит при взаимодействии двух IgE-молекул, связанных FcεRI, с аллергеном. Базофилы также могут быть активированы с помощью комплемента и хемокиновых рецепторов [11, 12, 13, 16].

Дегрануляция базофилов может протекать двумя путями: постепенным, когда клетки секретируют содержимое гранул без экзоцитоза, и полным - анафилактическим вариантом дегрануляции, когда клетки претерпевают быстрые морфологические изменения и наблюдается экзоцитоз внутриклеточных гранул, содержащих накопленные медиаторы [9, 17].

Базофилы экспрессируют уникальные поверхностные маркеры в зависимости от того, как клетки отвечают на аллергены, гаптены или неспецифические факторы. CD63 представляет собой лизосомально-ассоциированный мембранный гликопротеин-3 (LAMP-3), который является членом 53-кДа трансмембранного – 4-го суперсемейства тетраспанинов. В покоящемся базофиле, этот белок располагается на мембране внутриклеточных секреторных гранулах, а после стимуляции FcεRI, эти гранулы сливаются с плазматической мембраной и тем самым, CD63 экспрессируется на поверхности дегранулировавшихся базофилов, что ранее считалось непрямым маркером высвобождения гистамина [18]. Однако современные исследования показывают, что высвобождение гистамина может быть суммой обоих путей активации базофилов, а экспрессия CD63 может быть маркером только анафилактического типа дегрануляции [19, 20].

Дополнительный маркер активации базофилов – CD203c молекула, которая присутствует на CD34 + клетках-предшественниках базофилов, экспрессируется с низкой плотностью распределения на поверхности мембран базофилов и тучных клеток, но способна быстро повышать уровень экспрессии при активации клеток с помощью аллергена или более медленно под воздействием IL-3 [12, 20, 21, 22]. Считается, что эта экспрессия отличается от CD63 – уровнем стимуляции аллергеном и механизмом сигнальных событий, и более вероятно, связана с постепенной (частичной) дегрануляцией базофилов [11, 22, 23].

Полученные данные показывают [24, 25] широкие возможности теста активации базофилов для диагностики аллергии с помощью проточной цитометрии. Хотя, этот метод еще не стандартизирован (возникают вопросы по методам выделения, времени и условиям хранения и использования базофилов), для идентификации базофилов в образцах периферической крови обычно используется наличие IgE+, CCR3+, CD123+-молекул, в то время как присутствие CD63 и CD203c является маркерами активации. Была показана возможность проведения теста во время антимедиаторной терапии [24], а также его применение для мониторинга эффектов иммунотерапии [25].

Активация базофилов может быть специфической - путем связывания вещества аллергена с IgE-антителами, и неспецифической из-за их активации через рецепторы - PAMP (TLR) и другие активные структуры. Так выявляется неспе-

цифическая гиперчувствительность к лекарствам и другим веществам [12, 13].

Прямой тест дегрануляции базофилов основан на дегрануляции базофилов больных аллергией, сенсибилизированных антителами класса IgE. Под влиянием специфического аллергена, который связывается с антителами, базофилы дегранулируются. По существу метод является провокационным тестом с клетками больного. Натощак у больного забирают 5 – 20 мл (на 5-20 аллергенов) крови из вены в пробирку и обогащают лейкосуспензию на градиенте плотности для повышения количества базофилов. После этого добавляется аллерген, в контроле – забуференный физиологический раствор. Инкубируют, затем суспензией заполняют камеру Горяева и подсчитывают количество окрашенных базофилов. По количеству окрашенных базофилов тест считается, положителен при различии на 20-30% (существует несколько вариантов постановки) [3, 4, 7].

Реакция освобождения гистамина из базофилов под влиянием аллергена является важным аллергологическим тестом, с помощью которого изучены многие вопросы взаимодействия тучных клеток, базофилов, IgE-антител и аллергенов. Смешивают лейкоциты (базофилы), полученные от больных аллергией и несущие на поверхности IgE-антитела, с предполагаемым аллергеном и по количеству выделившегося гистамина (в процентах к общему количеству, содержащемуся в лейкоцитах с учетом спонтанного выделения) судят о сенсибилизации лейкоцитов к аллергену [2, 3, 4, 26].

Реакция аллергенспецифического повреждения лейкоцитов (РАПЛ) для определения их сенсибилизации. Гранулоциты, в частности нейтрофилы, больных с аллергией связывают антитела (класса IgG и IgE) и при добавлении соответствующего аллергена повреждаются, вплоть до полного лизиса. Повреждение гранулоцитов антигеном-аллергеном оценивают по окраске мертвых клеток 0,1% раствором трипанового синего не окрашивающего живые клетки. Для микроварианта используют объемы 0,025-0,05 мл, а для макроварианта – 0,25-0,5 мл. Индексы повреждения больше 0,15 указывают на наличие сенсибилизации полинуклеаров к антигену-аллергену [2, 3, 4, 26].

Реакция выброса миелопероксидазы (РВМ). На поверхности всех лейкоцитов, в том числе нейтрофилов, имеются Fc-рецепторы, которые связывают Fc-фрагменты иммуноглобулинов различных классов (IgG, IgE, IgA), в том числе обладающие специфичностью антитела.

В покое нейтрофилы имеют низкоаффинные рецепторы для IgG, FcγRIIA (CD32 А много), FcγRIII В (CD16 В) и могут связывать его в иммунных комплексах.

При аллергии они экспрессируют рецепторы FcγRI и FcεRI, а также гликопротеин галектин 3, связывающие IgE-антитела [27, 28, 29]. FcγRI (CD64) – высокоаффинный рецептор, который появляется на нейтрофилах при аллергии, способен связывать мономеры IgG (субклассы IgG₁, IgG₂, IgG₃). Связав IgG своими Fcγ рецепторами, они могут, взаимодействуя с аллергеном, приводить к развитию IgE-независимой "нейтрофильной" анафилаксии [30, 31]. После контакта с аллергеном нейтрофилы активируются и секретируют специфические для них ферменты, в частности – *миелопероксидазу*. Миелопероксидаза является специфическим и доступным для клинического исследования маркером гранулоцитов [7, 27]. Наибольшее ее содержание обнаружено в азурофильных секреторных гранулах нейтрофилов. Встраивание секреторных гранул в плазматическую мембрану гранулоцитов с последующей секрецией миелопероксидазы может запускаться хемоаттрактантами (например, N-формил-метионил-лейцил-фенилаланином или же при взаимодействии иммуноглобулинов, связанных Fc-рецепторами с соответствующими аллергенами, причем активность фермента

миелопероксидазы повышается до секреции ее из гранул [7, 27, 28, 29].

Сущность РВМ [10, 32] заключается в том, что определяется прирост активности миелопероксидазы после инкубации гранулоцитов с аллергенами в надосадочной жидкости по интенсивности окраски субстрат-хромогенной смеси, что позволяет диагностировать наличие или отсутствие сенсibilизации гранулоцитов и аллергии *in vitro* после измерения краски на фотометре (рис. 1) [10, 32].

Была проведена оценка возможности диагностического применения реакции аллерген-индуцированного повреждения лейкоцитов (РАПЛ) и реакции выброса миелопероксидазы гранулоцитами (РВМ) у взрослых больных аллергическими заболеваниями. на пищевые красители [33].

Положительная РАПЛ на разные красители наблюдалась в 3-9% случаев у больных аллергическими заболеваниями (таблица 2). Сходные результаты получены в РВМ, 4,8-15,3% на солнечный желтый положительная РВМ была только в 4,8% случаев. Всего у 21,9% больных аллергией была положительной на разные красители РАПЛ и у 32,5% - положительна РВМ, что можно оценить как тенденцию (p<0,06) к большей частоте положительных РВМ. Сенсibilизация лейкоцитов в РВМ к оксиду титана выявлялась достоверно чаще, чем в РАПЛ (p<0,024).

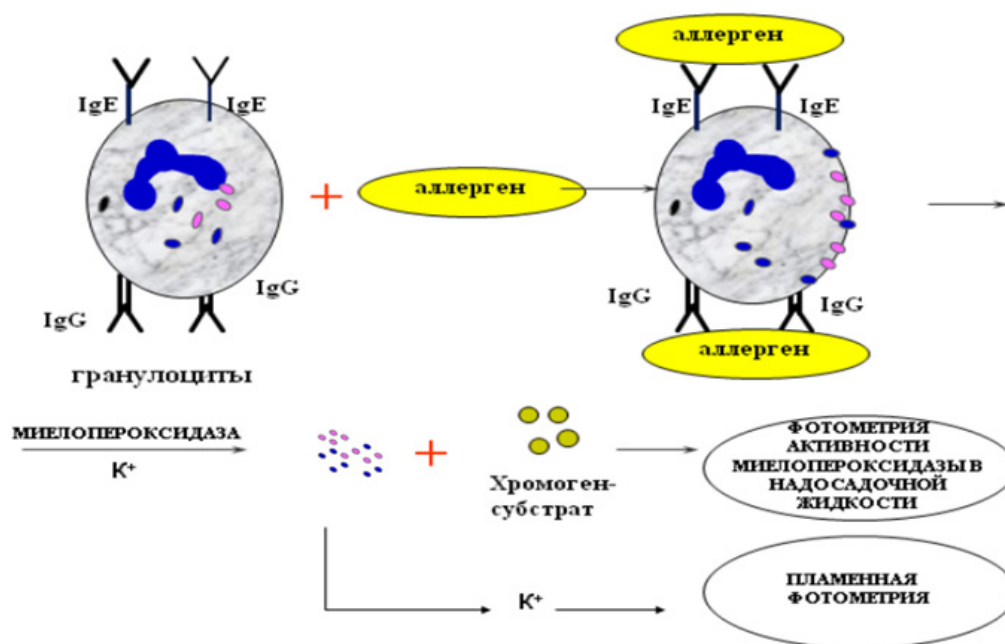


Рис. 1. Реакции выброса миелопероксидазы и ионов калия из нейтрофилов.

Между опытной (пациенты с бронхиальной астмой и атопическим дерматитом) и контрольной группой (больные бронхитом без аллергических заболеваний, но принимавших лекарственные препараты с красителями) имелись достоверные различия в частоте положительных РАПЛ и РВМ (таблица 2).

Методы РАПЛ и РВМ рекомендуется использовать для диагностики аллергии. В результате обследования выборок 30 больных опытной группы, имевших в анамнезе непереносимость добавок, и контрольной группы на все красители (отличие между результатами обследования опытной и контрольной групп $P < 0,01$) были установлены диагностические коэффициенты РАПЛ и РВМ для пациентов с аллергией на красители: РАПЛ: ДС – 94,0%, ДЧ – 83,3%, ДЭ – 87,3%; РВМ: ДС – 90%, ДЧ – 90%, ДЭ – 89%.

Достоинствами способа диагностики аллергии к пищевым красителям у больных аллергическими заболеваниями *in vitro* в реакции выброса миелопероксидазы гранулоцитами и реакции аллергенспецифического повреждения лейкоцитов являются следующие: выявление антител связанных клетками, что дает более точную диагностику в острый период заболевания и/или период контакта с аллергеном, простота метода, экономия трудозатрат и времени проведения реакции, возможность скрининговых исследований, достаточно высокая чувствительность и достоверность диагностики аллергии. Практическое применение предлагаемых методов в здравоохранении позволит повысить точность диагностики аллергии к пищевым добавкам, учитывая их разнообразный механизм действия и широкое присутствие как в продуктах питания, одежде, косметике, так и в лекарственных препаратах.

Тест угнетения аллергеном люминол-зависимой хемоллюминесценции сенсibilизированных лейкоцитов по существу основан на их повреждении. Выявлено, что в пробах крови больных с повышенной чувствительностью к аллергену интенсивность индуцированной хемиллюминесценции достоверно снижается по сравнению с пробами, инкубированными со средой Хенкса в тех же условиях. У здоровых доноров, подобного угнетения хемиллюминесценции не наблюдалось. [3].

Реакции, основанные на выделении сенсibilизированными лейкоцитами медиаторов, ферментов и других биологически активных веществ под влиянием аллергенов аналогичны феномену дегрануляции и повышения проницаемости клеточной мембраны, когда из лейкоцитов выбрасываются внутриклеточные молекулы [3, 6].

Наряду с медиаторами определяют выделение ферментов, в частности, триптазы, которая содержится в базофилах. Для этого используют коммерческие тест-системы. Одновременное определение выделения из лейкоцитов под влиянием аллергенов гистамина и триптазы повышает чувствительность метода с 60-70% до 85%.

Реакция выброса ионов калия из сенсibilизированных лейкоцитов (рис. 1) под влиянием аллергена по механизму близка к тесту либерации гистамина и лейкотриенов, однако проще их в исполнении. Под влиянием аллергенов из сенсibilизированных лейкоцитов выбрасываются ионы калия [3, 10]. Это происходит в результате взаимодействия аллергена и антител класса IgE и IgG, связанных базофилами и нейтрофилами [4, 7]. По приросту калия, оцениваемого на пламенном фотометре в надосадочной жидкости суспен-

Таблица 2. Различия частоты реакций гранулоцитов на красители у больных с аллергией и в контрольной группе по результатам РВМ и РАПЛ

Красители (0,001% растворы)	Группы			
	больные аллергией		больные бронхитом (n=25)	
	РАПЛ (n=114)	РВМ (n=83)	РАПЛ	РВМ
Кармуазин	*11 (9,6%)	*9 (10,8%)	1 (4%)	1 (4%)
Солнечный желтый	*9 (7,9%)	*4 (4,8%)	0	1 (4%)
Тартразин	*7 (6,1%)	*7 (8,4%)	0	0
Понсо	*7 (6,1%)	*11 (13,3%)	1 (4%)	*2 (8%)
Индигокармин	*4 (3,5%)	*7 (8,4%)	0	0
Оксид титана	*5 (4,4%)	*11 (13,3%)	0	0
Всего	*25 (21,9%)	*27 (32,5%)	2 (8%)	3 (12%)

Примечание – *достоверные различия с контрольной группой.

зии лейкоцитов, инкубированной с аллергенами, можно судить о сенсибилизации лейкоцитов. Увеличение концентрации калия в опыте более чем на 20%, по сравнению с контролем указывает на сенсибилизацию к аллергену [4, 7, 10].

Метод клеточных пятен (ELISPOT)

Сущность метода в том, что клетки крови культивируют в присутствии стимулятора (аллергена) в микропланшетах, дно которых покрыто антителами к цитокину. Клетки выделяют цитокины, которые связываются антителами, находящимися на планшете. Секретированные цитокины определяют с помощью меченных антител и нерастворимой субстрат-ферментной реакции, в результате которой вокруг секретировавших антитела, образуется пятно. Разработаны автоматические системы для подсчета пятен - т.е. секретирующих цитокин клеток.

Диагностика аллергии по изменению экспрессии активационных рецепторов нейтрофилов. Данные современных исследований подтверждают участие нейтрофилов в иммунопатогенезе аллергических и атопических заболеваний, причем в более 50% реакций анафилактического, так называемого IgE-зависимого типа [4, 5]. По изменению экспрессии активационных рецепторов на нейтрофилах, возможно оценивать их уровень сенсибилизации к аллергенам и неспецифическую гиперчувствительность. В настоящее время, исследования рецепторов на нейтрофилах показывает их тропность к стимуляции аллергенами: так при аллергических и атопических заболеваниях наблюдается повышение экспрессии CD64 (высокоаффинный рецептор FcγRI для IgG) повышение экспрессии CD35 (рецептор для компонентов комплемента C3b, C4b, iC3b и CD66b), повышение экспрессии CD11b и CD18, снижение экспрессии CD62L (селектин L, LAM-1, LECAM-1 [5, 7, 28, 31].

Выявление аллергии замедленного типа и сенсибилизации лимфоцитов

В настоящее время накапливается все больше данных о роли Т-клеточного распознавания в запуске всех видов аллергии. Выделены Т-клеточные клоны, сенсибилизированные к определенным эпитопам таких небольших молекул как лидокаин и β-лактамы, которые могут индуцировать аллергические реакции замедленного типа (Tx1) и/или синтез антител (Tx2). Т-клеточная сенсибилизация к аллергии присутствует при любом типе аллергической реакции и поэтому ее выявление является универсальным

методом диагностики аллергии, хотя и более сложным, как в методологии проведения тестов, так и в интерпретации результатов [5]. Диагностика замедленных аллергических реакций *in vitro* должна включать в себя подходы, которые могут быть применены на различных стадиях течения заболевания. Наибольшие трудности возникают в повседневной клинической практике, в основном из-за гетерогенных клинических проявлений и отсутствия селективных биологических маркеров гиперчувствительности замедленного типа в отношении аллергенов, антигенов или гаптенов разных групп: инфекционного или не инфекционного происхождения, лекарственных и др. аллергенов [5, 7, 9].

Сенсибилизацию Т-клеток выявляют: 1) по выделению ими цитокинов (медиаторов ПЧЗТ) в реакциях подавления (ингибиции) миграции лейкоцитов, угнетения прилипаемости лейкоцитов; 2) по усилению пролиферации Т-клеток под влиянием аллергенов – реакция бласттрансформации с морфологическим учетом бластов или по увеличению включения медленного 3Н-тимидина в их ДНК; 3) по изменению экспрессии активационных рецепторов лимфоцитов и в других тестах [4, 5, 7, 14].

Реакция подавления миграции лейкоцитов (РПМЛ). Сенсибилизированные лимфоциты при взаимодействии со специфическим антигеном (аллергеном) выделяют медиаторы ПЧЗТ, в частности фактор, подавляющий миграцию (ФПМЛ) или МИФ (MIF). Этот фактор подавляет миграцию других лейкоцитов – нейтрофилов. Аналогичный фактор появляется при стимуляции митогенами. Разработанный нами капиллярный метод отличается тем, что миграция клеток определяется путем их подсчета в лунках со средой, в которую они мигрируют из вертикально установленных капиллярных трубок, заполненных суспензией лейкоцитов [2, 3]. В данной реакции можно изучать ответ лимфоцитов на различные антигены (аллергены), митогены и выявлять сенсибилизацию лимфоцитов. Недостаток для клинических исследований этой реакции является сложность методики и длительность анализа до 48 ч.

Реакция подавления адгезии лейкоцитов (ПАЛ) является более удобной и быстрой, чем РПМЛ для выявления сенсибилизации лимфоцитов к аллергену. Способность лейкоцитов к прилипанию – адгезии обусловлена экспрессией особых структур – рецепторов, адгезинов, CD11/CD18, CD29, молекулам ICAM (CD50, CD102) и др. Под влиянием аллергенов способность к адгезии изменяется [3, 5]. Реакцию можно ставить с

цельной кровью. Положительной считают такую реакцию, когда средний процент прилипших клеток (всех лейкоцитов, лимфоцитов или гранулоцитов в отдельности) с антигеном - аллергеном достоверно меньше, чем в реакции с контрольным антигеном или без него [3, 5].

Реакция бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) выявляет замедленную Т-клеточную гиперчувствительность на лекарства. Применение радиоактивной метки, сложность и длительность постановки реакции (учет на 4-6 сутки), делают этот метод малодоступным для диагностики аллергии. Чувствительность теста составляет 56-78%, а специфичность - 85-93% [16]. Его специфичность доказана выделением аллергенспецифических Т-клеток к патогенам [15, 16]. Имеются сообщения об успешном его применении для дифференциальной диагностики токсических и аллергических гепатитов, медикаментозных аллергических панкреатитов [13]. У больных с токсическим гепатитом реакции были отрицательными. Однако у некоторых здоровых лиц, имевших контакт с лекарствами реакция тоже была положительной, как и у больных с аллергическими реакциями [13, 15].

Выявление сенсibilизации и гиперчувствительности Т-лимфоцитов по усилению на них экспрессии активационных рецепторов

При взаимодействии Т-лимфоцитов, имеющих специфический TCR-рецептор, с антигеном на их мембране усиливается экспрессия активационных молекул. Известен феномен повышения экспрессии активационных молекул CD25, CD71, HLA-DR, CD69 на мембранах Т- и В-лимфоцитов в присутствии аллергена [4, 5, 7]. Роль активированных CD25+ лимфоцитов, особенно с фенотипом CD4+CD25+ считается одной из центральных в регуляции иммунного ответа на аллерген, протекающего с синтезом ИЛ-10 и формированием толерантности иммунной системы к аллергену [4]. Сущность реакции в том, что с помощью моноклональных антител определяется прирост уровня лимфоцитов с молекулами активации - CD25, CD69 и др. [3, 14].

Диагностика неспецифической гиперчувствительности к патогенам

В настоящее время нет методов «специфических» для диагностики гиперчувствительности к патогенам, а само явление точно не определено.

Гиперчувствительность – это ответная реакция организма с клиническими симптомами на низкие дозы любых веществ и физических

факторов, которые не вызывают такой реакции у подавляющего большинства ($\approx 85\%$ и более) здоровых людей.

Гиперреактивность – повышенная ответная реакция организма с клиническими симптомами или признаками на любые дозы патогена, которые не вызывают такой реакции у большинства людей.

Гиперчувствительность зависит от количества и аффинности рецепторов клеток, связывающих конкретное вещество или активности структур, воспринимающих энергетические, волновые, тепловые, холодные сигналы.

Гиперреактивность как совокупный ответ организма зависит не только от исходных клеток, реагирующих на раздражитель-патоген, но и от других клеток, вовлекаемых в ответную реакцию, которую они могут усиливать или уменьшать.

Аллергия – совокупная реакция организма базируется на специфической гиперчувствительности и гиперреактивности. Гиперчувствительность при ней первична и обеспечивается антителами и рецепторами иммунных Т- и В-лимфоцитов, связывающими аллергены, запускающими дальнейшее развитие иммунной реакции, основанной на вовлечении в ответ других клеток, что и приводит в итоге к развитию гиперреактивности как конечной фазы аллергии.

Механизмы *неспецифической гиперчувствительности* (НГ) неясны. По-видимому, как и специфическая, аллергическая, она бывает двух типов – немедленная и замедленная и в ней участвуют системы врожденного иммунитета и лимфоциты. Примером первой может служить неиммунная активация комплемента через альтернативный или лектиновый путь с появлением анафилатонинов и клиникой анафилаксии (шока). К ней же можно отнести дегрануляцию базофилов, эозинофилов и нейтрофилов под влиянием неспецифических агентов и физических факторов (холод, тепло, вибрация, солнечные лучи, физическая нагрузка); клинически – это синдромы крапивницы, астмы и другие.

Замедленный тип НГ обусловлен активацией Т- и В-лимфоцитов и, возможно, моноцитов-макрофагов, эпителия и дендритных клеток. Причем эта активация различными агентами и факторами осуществляется через систему PAMP (Toll и др.) мембранных или внутриклеточных рецепторов. Пути активации различны и предложен ряд гипотез на примере НГ к лекарствам: накопление «реактивных» метаболитов, «сигналы опасности» для антигенпредставляющих клеток,

«р-і»-гипотеза непосредственной стимуляции препаратом Т-клеток не через антигенспецифический рецептор, а подобно суперантигену через β-цепь. Хотя и на лекарства нередко наблюдаются обычные иммунные аллергические реакции [16].

Для диагностики каждого типа или варианта немедленной или замедленной НГ используются специальные методы определения продуктов активации комплемента, маркеров активации клеток, их медиаторов и цитокинов, которые применяются и как тесты выявления иммунной реакции. В этом состоит универсальность клеточных тестов, позволяющих диагностировать специфическую иммунную и неспецифическую гиперчувствительность.

Гиперреактивность может быть обусловлена избыточной продукцией цитокинов, что связано с наличием полиморфных аллелей генов, обеспечивающих повышенный синтез провоспалительных цитокинов, например, ФНОα, ИЛ-1β и др. При сепсисе уровни ФНО, ИЛ-1β, ИЛ-18, но особенно ИЛ-6, увеличены в циркуляции. Функциональный полиморфизм генов цитокинов широко распространен и предрасполагает к заболеваниям. Его выявление может служить прогнозом заболеваний.

Синдромы неспецифической гиперчувствительности и гиперреактивности (без антител и иммунных Т-клеток) может основываться на исходной генетически повышенной реакции клеток врожденного иммунитета без возникновения адаптивного иммунного ответа. Они реализуются развитием аутовоспалительного синдрома. В него могут вовлекаться как клетки врожденного иммунитета, так и Т-, В-лимфоциты, но без антигенспецифического ответа.

Хотя существуют гуморальные механизмы гиперчувствительности (например, неспецифическая активация комплемента), однако клетки, а именно – лейкоциты, определяют большинство вариантов гиперчувствительности.

С помощью РВМ (см. выше) была впервые [34, 35] обнаружена гиперчувствительность нейтрофилов больных хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) и бронхиальной астмой на токсиканты – экстракт сигарет, сигаретный дым и выхлопные газы автомобилей. Оказалось, что после инкубации лейкоцитов больных с растворами этих токсикантов в надосадочную жидкость выделяется больше миелопероксидазы и других ферментов, чем из лейкоцитов контрольной группы. Эти данные указывают на гиперчувствительность нейтрофилов, которые дегранулируют под влиянием токсикантов и выделяют ферменты и

цитокины, что индуцирует аутовоспалительный процесс [34, 35].

Клеточные тесты позволяют оценивать неспецифическую гиперчувствительность на те же вещества, которые служат аллергенами. Дифференцировать специфичность от неспецифичности в некоторых случаях очень трудно, особенно, в случае лекарственных патогенов, хотя во время острой фазы мониторинг маркеров в коже и периферической крови помогает различать истинно аллергические и неаллергические, неиммунные реакции, которые, имея сходные клинические симптомы, опосредованы различными неиммунными механизмами. Так, используя тест стимуляции экспрессии CD69 молекул на Т-лимфоцитах, возможно, выявлять реакции гиперчувствительности к лекарствам [13, 16].

Все клетки (табл. 3) могут участвовать в реакциях гиперчувствительности, одни из них являются аллергенспецифическими и могут опосредоваться через связанный их FcεR-рецептором IgE, или IgG-антитела Fcγ-рецептором, другие – неспецифические, обусловлены активацией через иные (PAMP и др.) рецепторы.

Заключение

Все виды иммунопатологии представляют собой результат нарушений дифференцировки функции иммунокомпетентных клеток или их взаимодействия и регуляции. Для большинства из них характерна **генетическая предрасположенность**, реализуемая через рецепторы и цитокины клеток [5, 7]. В результате формируется патологический, **аномальный иммунный ответ**. Он встречается примерно у 10% индивидов, а патологичность и аномальность его может выражаться по-разному:

- агаммаглобулинемия – дефицит синтеза всех иммуноглобулинов
- дефицит синтеза G1, G2 и, как следствие компенсации, - появление антител IgM, IgA, не определяемых в тех тестах, которые используются для выявления IgG
- дефицит синтеза IgM
- гиперпродукция IgE – как следствие аллергического аномального ответа
- синтез «неполных» антител, не выявляемых в том или ином тесте
- наличие антииммуноглобулинов, препятствующих определению антител
- низко- и высокодозовая толерантность к антигену и подавление ответа
- аллергия

Таблица 3. Методы диагностики in vitro гиперчувствительности и аллергии

Объект исследования	Тесты	Гиперчувствительность	
		аллергическая	неспецифическая
IgE-антитела сыворотки крови	ИФА, МАСТ и др	+	-
Базофилы – IgE ⁺	Дегрануляция – гистамин, цитокины, активации CD63 ⁺ , CD203 ⁺	+	+
Нейтрофилы – IgE ⁺ , IgG ⁺	Повреждение – РАПЛ Дегрануляция – ферменты, РВМ, цитокины Активация – CD66 ⁺ и др., фагоцитоз, НСТ	+	+
T-лимфоциты – TCR	РБТЛ, РПМЛ Активация – CD69 ⁺ и др.	+	+
B-лимфоциты – CD19CD23 ⁺ , IgE ⁺	Активация – CD19 ⁺ CD23 ⁺ Секреция цитокинов, IgE ⁺	+	+
Дендритные клетки – IgE ⁺	IgE ⁺ и др.	+	-?
Моноциты/макрофаги	Активация – цитокины, фагоцитоз	?	+
Эпителий	Цитокины	?	+

- диссоциация иммунного ответа – угнетение синтеза антител на фоне гиперактивности иммунных T-лимфоцитов
- угнетение иммунного ответа из-за активации специфических супрессорных факторов системы иммунитета
- дефицит соответствующих T-хелперов и T-reg клеток
- другие причины, ведущие к недостатку антител к данному антигену.

Важнейшую часть иммунопатологии составляют аллергические заболевания и иммунодефициты. Обращает на себя внимание, что аллергические заболевания четко связаны с участием в иммунном процессе конкретных, облигатных аллергенов, т.е. по существу являются антиген-специфическими и для их диагностики используются соответствующие методы [3, 6].

Специфическая иммунодиагностика основана на классической оценке иммунной реакции, особенно ее вторичного ответа: это наличие антител классов IgE, G, A против какого-либо антигена-аллергена, хотя первичный ответ в типичной ситуации сопровождаются антителами класса IgM и их определение также может иметь большое диагностическое значение. Часть антител связывается антигеном, образуя иммунные комплексы. Другая – сорбируется клетками через Fc-рецепторную сеть: лимфоцитами, гранулоцитами, моноцитами-макрофагами, тромбоцитами, эндотелиальными клетками сосудов

и др. Даже при нормальном иммунном ответе выявляются лишь свободные антитела и в основном класса IgG – субклассы G1, G2, реже G3 и G4 [4, 5, 7, 8].

Современные методы алергодиагностики, основанные на рекламе брендовых, топовых производителей алергодиагностических тест-систем, так называемых «золотых стандартов диагностики», ориентированных на однократное определение узкого спектра антител одного IgE изотипа только в сыворотке крови к главным алергенам, заведомо не позволяют определить аномальный иммунный ответ и выявить антитела к конкретному антигену-аллергену в наиболее драматических ситуациях [3, 5, 9]. Примерно 20% больных имеют IgE-антитела к углеводам алергенов, не имеющие клинического значения. Использование рекомбинантных алергенов в чипах не решает всех проблем IgE-диагностики аллергии [36]. Врачам алергологам, иммунологам, терапевтам, педиатрам и другим специалистам, в настоящее время, должно быть понятным, что нет ни одного 100% теста для выявления гиперчувствительности к конкретному алергену, и особенно при поливалентной аллергии.

Диагноз аллергии всегда должен основываться на:

- алергоанамнезе и клинических данных
- результатах специфического алергологического обследования in vitro и in vivo.

Только комплекс методов, сочетающих тесты *in vivo* и *in vitro* (гуморальные и клеточные) обеспечивает точную диагностику аллергии. Однако преимущество клеточных тестов заключается в

том, что они позволяют выявлять и неспецифическую, неиммунную гиперчувствительность, которая нередко доминирует у больных и является основой заболевания.

Литература

1. Аллергология /Под ред. Г.Б. Федосеева. С.-Петербург, 2001; Т.1, 307с.
2. Новиков Д.К., Новикова В.И. Клеточные методы иммунодиагностики. Минск, 1979, 222 с.
3. Новиков Д.К., Новикова В.И. Оценка иммунного статуса, Москва, 1996, 315 с.
4. Schroeder JT. Basophils: Emerging roles in the pathogenesis of allergic disease. *Immunol Rev.* 2011; 242(1): 144-160.
5. Новиков Д.К. Новиков П.Д. Клиническая иммунопатология. Москва, 2009, 448 с.
6. Новиков Д.К. Клиническая аллергология. Мн., 1991, 523 с.
7. Новиков П.Д., Новикова Н.Д. Диагностика аллергии в реакции выброса миелопероксидазы под влиянием аллергена. *Имунопатология, аллергология, инфектология* 2002; №1: 63-69.
8. Тотолян А.А., Марфичева Н.А. Алешина Л.А. Иммуноглобулин Е в клинической практике. М., 1995: 120-122.
9. Новиков Д.К., Новиков П.Д., Сергеев Ю.В. Диагностика лекарственной аллергии. *Имунопатология, аллергология, инфектология* 2001; №1: 51-65.
10. Новиков Д.К., Новикова В.И. Способ определения сенсибилизации лейкоцитов. Авторское свидетельство СССР №445690, 14 июня 1974 г. Бюлл. №375.10.75 г.
11. Chirumbolo S1. Basophil activation test in allergy: time for an update? *Int. Arch Allergy Immunol.* 2012; 158 (2): 99-114.
12. Emily C. McGowan, MD and Sarbjit Saini. Update on the Performance and Application of Basophil Activation Tests. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2013 Feb; 13(1): 101-109.
13. Mayorga C, Sanz ML, Gamboa P, Garcia-Aviles MC, Fernandez J, Torres MJ. In Vitro Methods for Diagnosing Nonimmediate Hypersensitivity Reactions to Drugs. *Allergol Clin Immunol* 2013; Vol. 23(4): 213-225
14. Новиков Д.К., Новиков П.Д., Карпук И.Ю., Смирнова О.В., Выхристенко Л.Р., Величинская О.Г., Семенова И.В., Янченко В.В. Новые методы диагностики и иммунотерапии аллергии. *Аллергология и иммунология* 2015; Т. 16, №4: 335-339.
15. Новиков Д.К., Сергеев Ю.В., Новиков П.Д. Лекарственная аллергия. Москва: Национальная академия микологии, 2001, 330 с.
16. Elzagallaai A., Rieder M.J. In vitro testing for diagnosis of idiosyncratic adverse drug reactions: Implications for pathophysiology. *Br J Clin Pharmacol.* 2015; 80(4): 889-900.
17. Dvorak AM, MacGlashan DW, Jr, Morgan ES, Lichtenstein LM. Vesicular transport of histamine in stimulated human basophils. *Blood.* 1996; 88(11): 4090-4101.
18. Wolanczyk-Medrała A1, Gogolewski G, Liebhart J, Gomulka K, Litwa M, Panaszek B, Lindner K, Medrała W.J. A new variant of the basophil activation test for allergen-induced basophil CD63 upregulation. The effect of cetirizine. *Investig Allergol Clin Immunol.* 2009; 19(6): 465-473.
19. Knol EF, Mul FP, Jansen H, Calafat J, Roos D. Monitoring human basophil activation via CD63 monoclonal antibody 435. *J Allergy Clin Immunol.* 1991; 88(3 Pt 1): 328-338.
20. Macglashan D., Jr. Marked differences in the signaling requirements for expression of CD203c and CD11b versus CD63 expression and histamine release in human basophils. *Int Arch Allergy Immunol.* 2012; 159(3): 243-252.
21. Hauswirth AW, Sonneck K, Florian S, et al. Interleukin-3 promotes the expression of E-NPP3/CD203C on human blood basophils in healthy subjects and in patients with birch pollen allergy. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2007; 20(20): 267-278.
22. MacGlashan D., Jr. Expression of CD203c and CD63 in human basophils: Relationship to differential regulation of piecemeal and anaphylactic degranulation processes. *Clin Exp Allergy.* 2010; 40(9): 1365-1377.
23. Ocmant A1, Peignois Y, Mulier S, Hanssens L, Michils A, Schandené L. Flow cytometry for basophil activation markers: the measurement of CD203c up-regulation is as reliable as CD63 expression in the diagnosis of cat allergy. *J Immunol Methods.* 2007 Mar 30; 320(1-2): 40-8. Epub 2007 Jan 3.
24. Sturm EM1, Kranzelbinder B, Heinemann A, Groselj-Strele A, Aberer W, Sturm GJ. CD203c-based basophil activation test in allergy diagnosis: characteristics and differences to CD63 upregulation. *Cytometry B Clin Cytom.* 2010 Sep; 78(5): 308-318. doi: 10.1002/cyto.b.20526. Epub 2010 Apr 14.
25. Zitnik SE, Vesel T, Avcin T et al. Monitoring honeybee venom immunotherapy in children with the basophil activation test. *Pediatr Allergy Immunol.* 2012; 23(2): 166-172.
26. Карпук Н.А., Карпук И.Ю. Диагностика аллергии на металлические изделия в реакции алергениндуцированного повреждения лейкоцитов. *Мед. новости* 2012; №6: 75-76.
27. Monteseirin J, Bonilla I, Camacho MJ, Conde J, Sobrino F. IgE-dependent release of myeloperoxidase by neutrophils from allergic patients. *Clin. Exp. Allergy* 2001; Vol. 31: 889-892.
28. Zipfel M., Carmine T.C.; Gerber C. Niethammer D., Bruchelt G. Evidence for the activation of myeloperoxidase by f-meth-leuphe prior to its release from neutrophil granulocytes. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1997; №1: 209-212.
29. Monteseirín J. Neutrophils and Asthma. *Investig Allergol Clin Immunol* 2009; Vol. 19(5): 340-354.
30. Jonsson F., Chaisemartin L.D., Granger V. et al. Neutrophil Activation In Systemic Anaphylaxis: Results From The Multicentric NASA Study Symposium: Mechanisms for anaphylactic reactions. 7th Drug Hypersensitivity Meeting, Malaga, Spain, 21-23 Apr 2016: 7.
31. Jonsson F., Mancardy D.A., Albanesi M. et al. Neutrophils in local and systemic antibody-dependent inflammatory and anaphylactic reactions. *J of Leukocyte Biol;* Vol. 94, №4: 643-656.
32. Новиков П.Д., Новикова Н.Д., Новиков Д.К. Способ диагностики аллергии. Патент ВУ 9481, 2007 г.

33. Титова Н.Д. Сенсibilизация гранулоцитов к пищевым красителям у больных с аллергическими заболеваниями. Вестник ВГМУ 2010; Т.9, №4: 117-122.

34. Смирнова О.В. Индукция сигаретным дымом выброса миелопероксидазы лейкоцитами больных хроническими обструктивными заболеваниями легких. Иммунопатология, аллергология, инфектология 2015; №1: 64-70.

35. Смирнова О.В. Оценка гиперчувствительности нейтрофилов к токсикантам при хронических обструктивных заболеваниях легких. Российский иммунологический журнал 2015; Т. 9 (18), №3: 350-358.

36. Cramer R. The crux with a reliable in vitro and in vivo diagnosis of allergy. Allergy 2013; 68: 693-694.

Сведения об авторах:

Новиков Павел Дмитриевич – д.м.н., профессор кафедры клинической иммунологии и аллергологии Витебского государственного медицинского университета.

Новиков Дмитрий Кузьмич – профессор, д.м.н., зав. кафедрой клинической иммунологии и аллергологии Витебского государственного медицинского университета.

Титова Надежда Дмитриевна – д.м.н., доцент кафедры поликлинической педиатрии БелМАПО.

210023, г. Витебск, пр-т Фрунзе, 27, E-mail: all-vgmu@mail.ru

Поступила 26.08.2016 г.