

DOI: 10.14427/jipai.2017.2.70

Повышение пероксидазной активности в носовом лаваже и слюне у пациентов с аллергическим ринитом

Щурук И.Н., Новиков Д.К., Новиков П.Д., Ищенко О.В., Москалев И.К.

УО «Витебский государственный медицинский университет»

Determination of myeloperoxidase activity in nasal lavage and saliva in patients with allergic rhinitis

I.N. Shchurok, D.K. Novikov, P.D. Novikov, O.V. Ishchenko, I.K. Moskaliyov

Vitebsk State Medical University

Аннотация

Описана методика определения пероксидазной активности в носовом лаваже и слюне у пациентов с аллергическим ринитом.

Обнаружен исходно повышенный уровень пероксидазной активности в секретах (назальном лаваже и слюне) у больных аллергическим ринитом в сравнении с группой контроля, что может использоваться в диагностике аллергии. Метод оценки пероксидазной активности в назальном лаваже и слюне может быть применен для диагностики аллергического ринита. Диагностические уровни пероксидазной активности в назальном лаваже и слюне могут являться критериями нейтрофильной гиперчувствительности.

Ключевые слова

Аллергия, гиперчувствительность, диагностика in vivo, слюна, назальный лаваж.

Summary

A technique for peroxidase activity determination in nasal lavage and saliva in patients with allergic rhinitis is described. An initially increased level of peroxidase activity in secrets (nasal lavage and saliva) in patients with allergic rhinitis in comparison with the control group was found, which can be used in the diagnosis of allergy.

The method for peroxidase activity evaluation in nasal lavage and saliva can be used to diagnose allergic rhinitis. Diagnostic levels of peroxidase activity in nasal lavage and saliva (more than 1.011 and 1.061, respectively) may be criteria for neutrophil hypersensitivity.

Keywords

Allergy; hypersensitivity; in vivo diagnosis; saliva; nasal lavage.

Актуальность

Аллергический ринит представляет собой воспалительное заболевание слизистой оболочки носа, инициированное аллергическим иммунным ответом на ингаляционные аллергены у сенситизированных лиц.

Аллергическим ринитом (АР) болеют около 40% населения мира. Известно, что сохраняется тенденция роста заболеваемости.

АР способствует развитию или сопутствует бронхиальной астме (концепция «единая дыхательная система - единое заболевание»).

Высокая распространенность, социально-экономическая значимость патологии обосновывают актуальность исследований диагностики и лечения.

Известно, что при аллергических заболеваниях основными эффекторными клетками являются лейкоциты – базофилы (тучные клетки), гранулоциты – эозинофилы и нейтрофилы [1, 2, 3, 4]. На поверхности всех лейкоцитов имеются Fc-рецепторы, которые связывают Fc-фрагменты иммуноглобулинов различных классов (IgG, IgE, IgA), 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 и эозинофилы имеют FcεRI-рецепторы, связывающие IgE, а нейтрофилы несут Fcγ, фиксирующие IgG, и FcεRII CD23 (низкоаффинные) и лектин-галектин 3, способный связывать IgE. У больных аллергией помимо низкоаффинного рецептора FcεRII, на нейтрофилах появляются высокоаффинные – FcεRI [1, 2, 4]. После связывания этих IgE-антител с аллергеном лейкоциты, несущие их, активируются, дегранулируют и секретируют медиаторы и ферменты: эозинофильный катионный белок, эозинофильную пероксидазу, нейтрофилы – миелопероксидазу, эластазу и другие ферменты. Поэтому данные белки при аллергии присутствуют в различных биологических жидкостях (носовой секрет, слюна, лаважная жидкость и др.). После инкубации лейкоцитов крови больных аллергией с аллергенами наблюдается прирост миелопероксидазы в надосадочной жидкости. На этой основе для диагностики аллергии разработана реакция выброса лейкоцитами крови миелопероксидазы [5, 6].

Наличие нейтрофильной гиперчувствительности к аллергенам у больных аллергическими заболеваниями было показано в реакции выброса миелопероксидазы *in vitro* [2]. Следующим этапом стала разработка и апробация провокационных тестов *in vivo* для диагностики этой гиперчувствительности [7]. Был разработан трансбуккальный метод диагностики аллергии по увеличению пероксидазной активности в слюне при непосредственном воздействии аллергена на слизистую рта. Прототипами метода были «полоскательный тест» по А.Д. Адо [3], при котором определяется убыль лейкоцитов в слюне и реакция выброса миелопероксидазы в слюне [7].

Цель. Определение пероксидазной активности в носовом лаваже и слюне у пациентов с аллергическим ринитом и здоровых людей.

Материал и методы

Исследование проведено на базе аллергологического отделения ВОКБ и кафедры клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПК УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет».

Объект исследования: в исследовании приняли участие 31 пациент с верифицированным диагнозом аллергического ринита и 19 здоровых добровольцев без аллергопатологии на основании скрининг опросников. Средний возраст добровольцев составил 21,8 [21; 22], распределение по полу м\ж=2\17. Диагноз аллергического заболевания верифицировался по жалобам, анамнезу, положительным при предшествующих обследованиях кожным провам с бытовыми аллергенами, объективного обследования. Средний возраст пациентов составил 35,5 [31; 40], распределение по полу, м\ж =9\22 (таблица 1).

Все участники собственноручно заполнили добровольное информированное согласие Пациентами также проводилось самостоятельное заполнение опросников с целью изучения уровня контроля над симптомами ринита, оценка качества жизни. Оценка с использованием шкалы TNSS (Total Nasal Symptom Score), RQLQ.

Перечень необходимого оборудования: центрифуга (8000 об/мин), стерильные пробирки 10 – 20 мл (20-30 шт.), микропробирки 1,5 мл с крышкой (10-20 шт.), микроворонка (10 шт.), нейлоновые фильтры (10 шт.), холодильник, автоматические дозаторы 20 – 200 мкл, планшеты плоскодонные полистироловые для иммуноферментного анализа (ИФА), автоматический ИФА анализатор. Реактивы: физиологический 0,9% раствор хлорида натрия на фосфатном буфере (ФРФ) pH 7,2, фосфат-цитратный буферный раствор с pH 5,0, дистиллированная вода, перекись водорода 0,015% раствор, хромоген: тетраметилбензидин (ТМБ), серная кислота 4%, физиологический раствор хлорида натрия 0,9%, водно-солевые растворы аллергенов.

Показания к применению: определение исходного уровня пероксидазной активности в на-

Таблица 1. Демографическая характеристика больных

Показатели	Группы	
	Исследуемая n=31	Контрольная n=19
Возраст, г	35,5 [31; 40] *	21,8 [21; 22]
Пол, м\ж	9/22	2/17

Примечание: данные представлены как М [-ДИ; +ДИ], * p<0.05.

зальном лаваже и слюне. Диагностика аллергии. Возможность применения как скринингового методы диагностики. Противопоказания. Метод не имеет абсолютных противопоказаний. Относительные противопоказания: Повреждения и заболевания ротовой полости; гипосаливация у больного – менее 1 мл слюны; гнойно-воспалительные заболевания ЛОР-органов.

Метод включает несколько этапов:

1. Забор исходной слюны больного

1.1. Больной за 12 часов до тестирования не употребляет алкоголь, продукты с кофеином, противоаллергические лекарственные средства (антигистаминные, глюкокортикостероиды), не курит, исключает продукты с высокими аллергенными свойствами. Исследование проводится натощак.

1.2. Слюну в объеме 1 мл собирают в микропробирки, закрывают крышкой.

1.3. Носовой секрет в объеме 1 мл собирают в микропробирки методом назального лаважа, орошая носовую полость физиологическим раствором объемом 1 мл с помощью инсультатора.

2. Полученную слюну и назальный лаваж пропускают через нейлоновые фильтры, затем центрифугируют при 8000 оборотах в течение 10 мин.

3. Ход реакции

- в шесть лунок планшета для ИФА вносят по 100 мкл 0,9% раствора хлорида натрия (пробы дублируют);
- в первую лунку добавляют 100 мкл слюны, собранной до проведения провокационного теста, перемешивают, получается разведение слюны 1:2;
- во вторую лунку вносят 100 мкл разведенной (1:2) слюны из первой лунки, перемешивают – получают разведение 1:4;
- во третью лунку вносят 100 мкл разведенной (1:4) слюны из второй лунки, перемешивают – получают разведение 1:8, 100 мкл отсасывают и выливают;
- процедуру повторяют в такой же последовательности с 4-6 лунками для слюны, полученной после провокационной пробы.
- носовой секрет разведения не требует, поэтому в первую лунку добавляют 100 мкл носового секрета, собранного до проведения провокационного теста, а во вторую лунку по 100 мкл носового секрета после провокации.
- все пробы дублируют.
- внесение проявляющего раствора. Во все лунки планшеты для ИФА к разведенной слюне добавляют по 100 мкл хромоген-субстратной

смеси (0,015% перекись водорода и ТМБ, разведенными фосфат-цитратным буфером с рН 5,0). Проявляющий раствор готовят непосредственно перед внесением;

- инкубируют при комнатной температуре в течение 10-25 мин до появления выраженного окрашивания синего цвета (на этом этапе реакцию оценивают визуально по интенсивности окраски от "-" до "++++" по сравнению с контролем);

- реакцию останавливают внесением 100 мкл 4% серной кислоты, цвет раствора изменяется на желтый.

5. Учет результатов

Реакцию оценивают через 10 минут на фотометре (ИФА анализаторе) при длине волны 450 нм в единицах оптической плотности (Еоп).

Статистическая обработка и представление данных

Для интерпретации результатов теста использовали ROC кривую (Receiver Operating Characteristic Curve) для расчета оптимального порога отсечения (optimal cut-off value) (MedCalc – version 15.6.1). арифметического и доверительного интервала М [-ДИ; +ДИ]; медиана и величины интерквартильного размаха Ме (25%;75%). Различия считали достоверными при вероятности $p < 0,05$.

Статистическая обработка и представление данных производилась с помощью программы Statistica 10. Полученные данные не имели характер нормального распределения. Для статистического анализа применяли параметрический метод (T-test).

Результаты и обсуждение

Выявлены различия в уровне пероксидазной активности в назальном лаваже и слюне в группах пациентов и здоровых людей.

У пациентов с аллергическим ринитом был выявлен достоверно повышенный уровень пероксидазной активности в назальном секрете ($p=0,0027$) и слюне ($p=0,003$) чем в контрольной группе здоровых, что может являться критерием нейтрофильного воспаления слизистой, т.е. подтверждением гиперчувствительности слизистой оболочки в целом (таблица 2). Обращает на себя внимание синхронность повышения пероксидазной активности в назальном секрете и слюне. Это указывает на вовлечение эозинофилов и нейтрофилов слизистой оболочки рта в аллергический воспалительный процесс при ринитах.

По данным ROC анализа получено, что диагностический критерий пероксидазной активности назального лаважа больше 1,011. Чувствительность метода 61,3%, специфичность 78,9%, $p=0,0004$, AUC 0,745 (рис. 1).

Диагностический критерий пероксидазной активности слюны больше 1,061. Чувствительность метода 64,5%, специфичность 94,7%, $p=0,0026$, AUC 0,717 (рис. 2).

Таблица 2. Уровни пероксидазной активности в назальном лаваже и слюне

Пероксидазная активность	Уровни E_{on}		p-level
	Группа 1 Пациенты (n=31) М [-ДИ; +ДИ]	Группа 2 Здоровые (n=19) М [-ДИ; +ДИ],	
в назальном лаваже	1,46[1,18;1,74]	0,83[0,57;1,08]	0,0027
в слюне в разведении 1:8	1,28[1,01;1,56]	0,72[0,58;0,86]	0,0032

Примечание: * $p<0,05$ достоверные отличия между группами

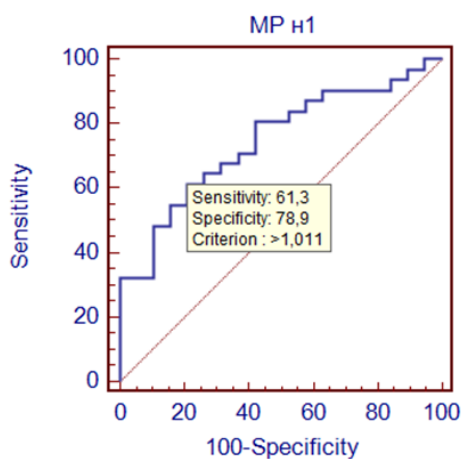


Рис. 1. Диагностический критерий пероксидазной активности лаважа носа пациентов с аллергическим ринитом

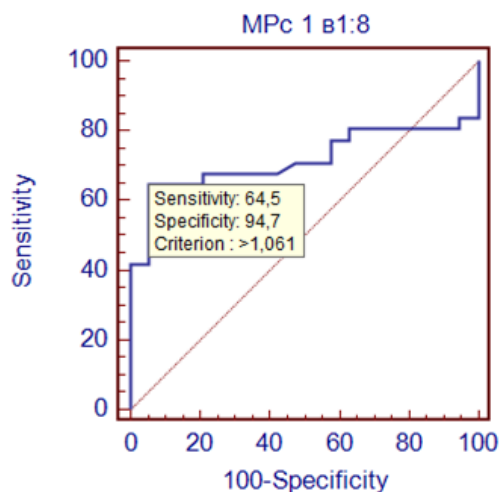


Рис. 2. Диагностический критерий пероксидазной активности слюны пациентов с аллергическим ринитом

Выводы

1. Обнаружен исходно повышенный уровень пероксидазной активности в секретах (назальном лаваже и слюне) у больных аллергическим ринитом в сравнении с группой контроля, что может использоваться в диагностике аллергии.
2. Повышение пероксидазной активности в слюне при аллергическом рините указывает на вовлечение в аллергический процесс эо-

зинофилов и нейтрофилов слизистой оболочки рта.

3. Метод оценки пероксидазной активности в назальном лаваже и слюне может быть применен для диагностики аллергического ринита. Повышенные уровни пероксидазной активности в назальном лаваже и слюне (больше 1,011 и 1,061 E_{оп} соответственно) могут являться критериями нейтрофильной гиперчувствительности.

Литература

1. Новиков Д.К., Новиков П.Д. Клиническая иммунопатология: руководство. М.: Мед. лит., 2009, 464 с.
2. Новиков П.Д. Иммунодиагностика. Витебск, 2006, 250 с.
3. Хаитов Р.М., Ильина Н.И. Аллергология и иммунология. Национальное руководство. ГЭОТАР-Медиа, 2009, 380 с.
4. Monteseirin J. Neutrophils and asthma. J Investing Allergol Clin Immunol 2009; Vol. 19(5): 340-354.
5. Новиков П.Д., Новикова Н.Д. Диагностика аллергии в реакции выброса миелопероксидазы под влиянием аллергена. Иммунопатология, аллергология, инфектология 2002; №1: 63-68.
6. Титова Н.Д. Применение реакции выброса миелопероксидазы гранулоцитами для диагностики аллергии к пищевым добавкам. Клиническая лабораторная диагностика 2011; №2: 42-45.
7. Новиков Д.К., Новиков П.Д., Карпук И.Ю. и др. Трансбуккальный метод диагностики аллергии по увеличению пероксидазной активности в слюне. Иммунопатология, аллергология, инфектология 2015; №4: 35-43.

Сведения об авторе:

Щурук Ирина Николаевна - ассистент кафедры клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПК УО «Витебский государственный медицинский университет» 210023 г. Витебск. пр-т Фрунзе, 27. Тел. +375-29-969-48-59, e-mail: shchurok.irina@mail.ru.

Поступила 28.04.2017 г.