

Повышение активности ферментов назального лаважа и ротовой жидкости при аллергическом рините под влиянием низких доз аллергена

И.Н. Щурок

Витебский государственный медицинский университет, Витебск, Беларусь

Increase in the enzymatic activity of nasal lavage and oral fluid in allergic rhinitis under the influence of low allergen doses

I.N. Shchurok

Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus

Аннотация

Целью работы была оценка изменения уровня миелопероксидазы и триптазы в назальных смывах и ротовой жидкости у больных с аллергическим ринитом после назальной провокации с аллергеном клеща *Dermatophagoides pteronyssinus*.

Методы. Обследованы 25 пациентов с установленным диагнозом аллергического ринита и 18 здоровых людей. Всем обследуемым был выполнен провокационный назальный тест с помощью инстилляций минимальной дозы (10PNU) водно-солевого раствора аллергена клеща рода *Dermatophagoides* pt. Назальный лаваж и ротовую жидкость забирали у всех участников до провокации и через 30 мин для определения уровня миелопероксидазы и триптазы.

Результаты. Воздействие 10 PNU аллергена клеща на слизистую оболочку носа у пациентов с аллергическим ринитом достоверно увеличивало уровни миелопероксидазы и триптазы как в назальном лаваже, так и в ротовой жидкости. Эта доза 10 PNU в провокационном тесте ни у одного из обследуемых не вызвала клинических симптомов ринита.

Вывод. Корреляция увеличения триптазы и миелопероксидазы в назальном лаваже и слюне после назальной провокации клещевым аллергеном свидетельствует о взаимосвязи аллергической реакции слизистых оболочек носа и ротовой полости на субклинические дозы аллергена.

Ключевые слова

Аллергический ринит, провокационный назальный тест, триптаза, миелопероксидаза назального лаважа, ротовой жидкости.

Summary

Aim of study: Determination of changes in the enzymatic activity of tryptase and myeloperoxidase in nasal lavage and oral fluid in patients with allergic rhinitis before and after the provocative nasal test with the *Dermatophagoides pteronyssinus*.

Material and methods. The study included 25 patients with allergic rhinitis and 18 healthy patients without allergy pathology. Provocation nasal test with the minimal dose (10PNU) of allergen mite *Dermatophagoides* pt. was performed on all study participants.

Results. Exposure of 10 PNU allergens of the mite to the nasal mucosa in patients with allergic rhinitis significantly increased the levels of myeloperoxidase and tryptase in both nasal lavage and oral fluid. This dose of 10 PNU in the provocative test did not cause any clinical symptoms of rhinitis in one of the subjects.

Conclusion. Correlation of tryptase and myeloperoxidase increases in nasal lavage and saliva after provocative nasal test with allergen mite *Dermatophagoides* pt. indicates the relationship of the allergic reaction of the nasal mucosa and oral cavity to the subclinical dose of the allergen.

Keywords

Allergic rhinitis, nasal provocation test, tryptase, myeloperoxidase, nasal lavage, oral fluid.

Введение

Аллергический ринит (АР) представляет собой реакцию назальной слизистой, возникающую в ответ на экспозицию аллергена. Она характеризуется дегрануляцией лейкоцитов и выделением различных медиаторов воспаления, факторов роста, хемокинов, цитокинов, и т.д. [1, 2]. Для диагностики АР используют кожные пробы и определение уровня IgE-антител. Данные, наиболее распространенные методы диагностики, не позволяют четко верифицировать диагноз, так как системные проявления не всегда отражают иммунологический процесс, происходящий на уровне слизистых оболочек [1,3]. Провокационный назальный тест с аллергеном позволяет установить диагноз на уровне шокового органа. Изменения уровня основных медиаторов, ферментов может быть использовано и в диагностике, и как маркер эффективности терапии [4]. Определение профиля медиаторов, цитокинов в назальном секрете и ротовой жидкости может быть применено в качестве диагностического инструмента. Факт изменения уровня биомаркеров на уровне смежных слизистых оболочек верхних дыхательных путей после проведения провокационного назального теста подтверждает концепцию единства мукозального иммунитета.

Взаимосвязь между ротовой полостью и носом включает как анатомические структуры, так и функциональные взаимодействия [5]. Слизистая оболочка носа связана с полостью рта посредством кровеносных сосудов, сетью лимфатической и нервной систем [6]. Происходящие аллергические реакции в первую очередь в слизистой оболочке носа из-за интраназального воздействия ингаляционного аллергена могут воздействовать на слизистую оболочку полости рта, а затем и на другие слизистые оболочки верхних дыхательных путей, такие как слизистые трахеи, бронхов различными способами и при участии различных механизмов [7]. Эти механизмы включают многие типы клеток, участвующих в аллергических реакциях: от клеток крови до эпителиальных и эндотелиальных. [8] Эти клетки, активированные и / или ингибированные во время аллергической реакции в слизистой оболочке носа, генерируют и высвобождают ряд факторов (классические медиаторы, эйкозаноиды, цитокины, хемокины, хемотаксические и другие факторы), которые затем могут влиять на верхние дыхательные пути или опосредованно воздействовать через систему кровеносных и / или лимфатических сосудов.

Аллергическая реакция может также активировать местную нервную систему (сенсорные нервы, симпатические и парасимпатические волокна), высвобождая затем нейропептиды. В этой реакции участвует местная лимфоидная система слизистой оболочки носа, называемая «носовой» лимфоидной тканью» (NALT), являющаяся частью «мукозо-ассоциированной лимфоидной ткани» (MALT). Система MALT обеспечивает множественное и взаимное сообщение между конкретными подсистемами, связанными с лимфоидными органами, между NALT и «лимфоидной тканью, связанной с глазами» (EALT), «конъюнктивальной лимфоидной тканью» (CALT) и «бронхо-ассоциированной лимфоидной тканью» (BALT) и т.д. Обилие взаимоотношения между отдельными частями лимфоидной системы осуществляется не только через многократную передачу различных сигналов (например, клетка-клетка, клетка-рецептор, рецептор-рецептор), но также реципрокный (в обоих направлениях) трафик различных типов циркулирующих клеток [9, 10, 11].

Определенные подтипы лимфоцитов, первоначально активированных в определенной ткани (слизистая оболочка носа), после миграции в кровотока и / или лимфатическую сеть, чтобы закончить процесс их созревания, не возвращаются к этой оригинальной ткани и из-за нарушенного фактора самонаведения они прекращают свой путь, входя в другую ткань, отличную от первоначально активированной (например, слизистая оболочка полости рта или слизистая оболочка дыхательных путей). Этот процесс называется «неправильное возвращение» [12, 13]. Данные подтверждают факт, что до 80% случаев аллергического ринита впоследствии трансформируется в бронхиальную астму [14].

Медиаторы, наиболее часто изучаемые в назальном лаваже, включают гистамин, триптазу, эозинофильный катионный белок (ECP), лейкотриены (LTB₄, LTC₄, LTD₄), миелопероксидазу (MPO), простагландины (PGD₂, PGE₂) и различные цитокины [14,15].

Большинство исследований направлено на определение медиаторов в назальном лаваже у пациентов с аллергическим ринитом [15], но учитывая единство мукозального иммунитета, мы предлагаем способ диагностики аллергического ринита, основанный на определении медиаторов и в ротовой жидкости после проведения провокационного назального теста с аллергеном.

Провокационный назальный тест эффективен тогда, когда он обеспечен объективными метода-

ми оценки. К таковым относятся риноманометрия и определение в назальном секрете медиаторов реакций немедленного типа [10]. Оценка с помощью риноманометрии требует привлечения смежных специалистов (ЛОР-врачей), а также наличие дорогостоящего оборудования (риноманометра).

Удобство сбора слюны в отличие от сбора назального секрета, неинвазивность методики, легковоспроизводимость, отсутствие провокации клинических проявлений (как в классической методике) – все это определяет преимущества низкодозового провокационного теста как метода диагностики для пациентов.

Цель исследования – разработка способа диагностики аллергического ринита путем оценки активности миелопероксидазы, триптазы назального лаважа и ротовой жидкости после проведения низкодозового провокационного назального теста с аллергеном.

Материалы и методы исследования

Исследования проведены в аллергологическом отделении Витебской областной клинической больницы. Обследовано 25 пациентов с аллергическим ринитом и 18 здоровых людей (на основании опросников и осмотра выявлено отсутствие без аллергопатологии). Группы обследуемых были сопоставимы по возрасту и полу. Средний возраст пациентов был 27 лет (у добровольцев 22) с почти равным распределением по полу. Верификацию аллергических нозологий заболевания проводили по жалобам, анамнезу, результатам предшествующих аллегопроб с бытовыми аллергенами, данным объективного обследования (табл. 1).

Проспективное клиническое исследование было проведено с октября 2018 г. по март 2019 г., включало 2 посещения врача:

Скрининговое обследование включало:

- заполнение информированного согласия (согласно Хельсинской декларации);
- самостоятельное заполнение опросников (оценка качества жизни RQLQ, оценка индекса назальных симптомов TNSS);
- забор крови для определения уровня специфических IgE-антител к аллергену клеща *Dermatophagoides pteronyssinus*;
- проведение кожного аллергологического тестирования с аллергеном клеща *Dermatophagoides pt.*

Провокационный тест включал:

- обследуемые накануне в течение 12 часов исключали из рациона продукты, содержащие кофеин, острые специи, алкоголь, не курили, а также в течение 3 дней не применяли антигистаминные препараты 1 поколения и 7 дней антигистаминные препараты 2 поколения, глюкокортикостероиды, антидепрессанты, НПВС, антилейкотриеновые лекарственные средства; исследование проводили натощак, вне обострения аллергического ринита;
- оценка индекса назальных симптомов TNSS (заполнение опросника);
- сбор назального секрета и ротовой жидкости осуществляли перед тестированием аллергеном и через 30 минут после провокации; назальные лаважи производили инстилляцией в носовые ходы 6 мл стерильного физиологического раствора комнатной температуры; жидкость собирали в микропробирки, которые затем центрифугировали при 8000 об/мин 10 минут с последующим фильтрованием су-

Таблица 1. Характеристика обследованных групп

Показатели	Группы	
	Пациенты с АР n=25	Здоровые добровольцы n=18
Возраст, г	27(25;29)	22(20;23)
Пол, м/ж	11/14	7/11
Индекс назальных симптомов (TNSS)	≤ 2*	0
Кожное тестирование с аллергеном клеща рода <i>Dermatophagoides pt.</i>	положительные* -25	Отрицательные-18
Наличие IgE антител к аллергену клеща <i>Dermatophagoides pt.</i> в сыворотке крови, МЕ/л	57[51;69]	Не определяли

Примечание: данные представлены как М[-ДИ;+ДИ].

- пернатанта через нейлоновые синтетические фильтры (проба Но и Со).
- провокационный назальный тест с истилляцией аллергена клеща *Dermatophagoides pteronyssinus* в дозе 10 PNU («Биомед», Москва) без последующего наращивания дозы; разведение аллергена было выполнено физиологическим раствором для исключения дегрануляции лейкоцитов под действием разводящей жидкости, содержащей фенол; данную минимальную дозу аллергена определяли путем предварительного алергометрического кожного тестирования пациентов с аллергическим ринитом.
 - оценка индекса назальных симптомов TNSS после провокации.
 - ферменты в назальном лаваже и слюне определяли с помощью ELISA Kit тест систем для определения триптазы и миелопероксидазы (производства Elabscience Biotech и Cloud-Clone Corp, США).
 - учет результатов осуществляли с помощью статистической обработки данных с использованием программы Statistica 10.

Результаты и обсуждение

Двадцати пяти пациентам с аллергическим ринитом и восемнадцать здоровыми участниками (табл. 1) выполнен назальный провокационный тест аллергеном *D. pteronissimus* в дозе 10 PNU с целью определения изменения уровня миелопероксидазы, триптазы в назальном лаваже и ротовой жидкости. Учитывая минимальную дозу аллергена и отсутствие наращивания дозы аллергена, провокации побочных реакций не было ни у одного из участников, что также способствует приверженности пациентов к обследованию и позволяет создать комплаинс между пациентами и врачами.

Показатель назальных симптомов по шкале TNSS, который был оценен до провокации у здоровых участников и пациентов с аллергическим ринитом различался достоверно ($P < 0,05$). Эти различия сохранились также и после провокационного теста, т.к. провокация не вызвала клинических проявлений.

У 22(88%) пациентов с аллергическим ринитом после проведения провокационного назального теста выявлен достоверный прирост уровня триптазы ($p=0,004$) в отличие от здоровых добровольцев. Средний процент прироста уровня триптазы в назальном лаваже составил в группе пациентов составил 23.34%. Достоверного прироста триптазы у здоровых добро-

вольцев не наблюдалось. Аналогичная ситуация наблюдалась и в изменении уровня триптазы в ротовой жидкости у пациентов с аллергическим ринитом после проведения провокации на уровне слизистой оболочки носа. Достоверный прирост уровня триптазы в ротовой жидкости составил 16,4%. Изменение уровня триптазы в ротовой жидкости у здоровых добровольцев не наблюдалось. Уровень корреляции прироста уровня триптазы в назальном лаваже и ротовой жидкости составил $R=0,61$.

Наблюдая отсутствие изменений уровня триптазы в контрольной группе при проведении провокационного назального теста с аллергеном, мы можем сделать вывод о дегрануляции базофилами триптазы при немедленных IgE-зависимых аллергических реакциях. Соответственно, достоверное увеличение уровня триптазы в назальном лаваже и ротовой жидкости после проведения назальной провокации становится показателем аллергических реакций немедленного типа и может служить объективным критерием оценки провокационного теста с аллергеном.

При изучении миелопероксидазы в назальных смывах после провокационного теста выявлено, что у 15(60%) пациентов с аллергическим ринитом наблюдался прирост уровня миелопероксидазы в назальном лаваже на достоверном уровне ($p=0,003$). Процентный прирост в назальном лаваже у пациентов с АР составил 25 %. Через 30 минут после проведения провокационного назального теста отмечалось также достоверное повышение уровня миелопероксидазы в ротовой жидкости ($p=0,001$), хотя аллерген был нанесен на слизистую оболочку носа. Тест был положительный у 12 пациентов (48 %). Средний уровень прироста миелопероксидазы в ротовой жидкости у пациентов с аллергическим ринитом составил 10,3%, что достоверно выше ($p=0,003$), чем прирост у здоровых добровольцев (0%). Диагностический критерий уровня прироста миелопероксидазы в ротовой жидкости был более 6,5% в соответствии со статистическими расчетами (по данным ROC-анализа) при исследовании сверхнизких доз аллергена для провокации; чувствительность 64,5%; специфичность 68,4%, AUC 0,68 (рис. 1).

В группе пациентов с АР уровни миелопероксидазы, а также и триптазы в назальном лаваже достоверно увеличивались после проведения провокационного назального теста с аллергеном ($p=0,003$ и $p=0,0006$ соответственно).

Повышение уровня миелопероксидазы в назальном лаваже и ротовой жидкости у пациен-

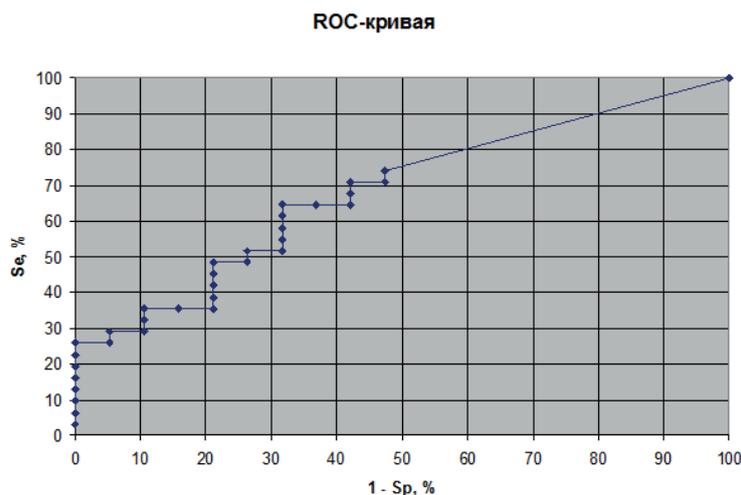


Рис. 1. Диагностический критерий прироста миелопероксидазы в ротовой жидкости у пациентов с аллергическим ринитом.

тов с аллергическим ринитом по сравнению с группой контроля может выступать в качестве индикатора нейтрофильного воспаления слизистой, отражая гиперчувствительность клеток слизистой оболочки.

У 60% пациентов с аллергическим ринитом четко определяется прирост миелопероксидазной активности в назальном смыве уже после минимального назального теста. Это можно использовать как диагностическое указание на аллергическое заболевание с нейтрофильной гиперчувствительностью.

Прирост миелопероксидазы в ротовой жидкости более чем на 6,5% после проведения низкодозового провокационного назального теста с аллергеном клеща *Dermatophagoides pteronyssinus* может применяться для диагностики аллергического ринита. Данный факт является подтверждением гипотезы о едином мукозальном иммунитете.

Удобство сбора слюны в отличие от сбора назального секрета, неинвазивность методики, легковоспроизводимость, отсутствие провокации клинических проявлений (как в классической методике) – все это определяет преимущества низкодозового провокационного теста как метода диагностики для пациентов. Повышение миелопероксидазы в назальном лаваже и слюне при провокации аллергеном свидетельствует о клеточно-опосредованных реакциях на аллерген,

подтверждая полиморфность аллергического воспаления на слизистых оболочках.

Выводы

1. Результаты исследования демонстрируют возможности применения провокационного назального теста с субклиническими дозами аллергенов.
2. Увеличение в назальном лаваже и ротовой жидкости после воздействия аллергена на шокосый орган (слизистую оболочку носа) подтверждает клеточно-опосредованные реакции с вовлечением тучных клеток, базофилов, нейтрофилов в аллергический процесс слизистой оболочки ротовой полости.
3. Определение уровня триптазы и миелопероксидазы может быть применено для диагностики аллергического ринита как объективный критерий провокации.
4. Корреляция увеличения миелопероксидазы, триптазы в назальном лаваже и ротовой жидкости после проведения провокационного назального теста указывает на единство реакций мукозального иммунитета слизистых оболочек носа и ротовой полости.

Литература

1. Быкова В.П. Структурные основы мукозального иммунитета верхних дыхательных путей. Российская ринология 1999; №1: 5-11.
2. Гуцин И.С., Ильина Н.И., Польшнер С.А. Аллергический ринит: Пособие для врачей. М., 2002, 68 с.
3. Емельянов А.В. Современные представления о диагностике и лечению аллергического ринита. Леч. врач 2003; №3: 4-11.
4. Ильина Н.И. Эпидемиология аллергического ринита. Российская ринология, 1999; 1: 23-5.
5. Ковалева Л.М., Тимофеева Г.И., Москаленко Л.Н. Результаты лабораторного обследования детей с поражением лимфаденоидного кольца глотки. Новости отоларингологии и логопатологии 1998; №2(4): 75-77.
6. Тарашенко Т.И. и соавт. Иммуноterapia при заболеваниях ЛОР-органов у детей. Иммунокоррекция в педиатрии, под ред Костинова М.П., М., 1997: 40-48.
7. Ширинский В.С., Старостина Н.М., Сенникова Ю.А. и др. Проблемы иммуностимулирующей терапии с позиций доказательной медицины. Мед. иммунология 2000; Т. 2, №1: 17-24.
8. Ярилин А.А. Иммунология. М.; Медицина, 1999.
9. Неотложная терапия и профилактика аллергических заболеваний. / Под редакцией Д.К. Новикова. Витебск, 2008, 354 с.
10. Новиков Д.К. (ред.) Иммунология и аллергология для ЛОР-врачей. М.: «МИА», 2006, 353 с.
11. Новиков Д.К. Клиническая аллергология. – Мн.: Высшая школа, 1991, 511 с.
12. Новиков Д.К. Новиков П.Д. Клиническая иммунопатология, М, 2009, 347 с.
13. Новиков П.Д. Иммуноаллергодиагностика, ВГМУ, 2006, 293 с.
14. Патерсон Р., Грэммер Л.К., Гринбергер А. Аллергические болезни (диагностика и лечение). Пер. с англ. М., Медицина, 1997, 540 с.
15. Akdis C.A., Hellings P.W., Agache I. Global Atlas of Allergic Rhinitis and Chronic Rhinosinusitis. European Academy of Allergy and Clinical Immunology, 2015, 280 p.
16. Augé J., Vent J., Agache I., et al. EAACI Position paper on the standardization of nasal allergen challenges. Allergy. 2018; 73: 1597-1608.

Сведения об авторе:

Щурок И.Н. – ассистент кафедры клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПК Витебского государственного медицинского университета. 210602 Витебск, пр. Фрунзе, 27. e-mail: all-vgmu@mail.ru.

Поступила 12.02.2019 г.