

Аллерген повреждает нейтрофилы слизистой оболочки рта у больных атопической бронхиальной астмой

И.К. Москалев, И.Н. Щурок, Д.К. Новиков

Витебский государственный медицинский университет

Allergen damages the neutrophils of the oral mucosa in patients with atopic bronchial asthma

I.K. Moskalev, I.N. Shchurok, D.K. Novikov

Vitebsk State Medical University

Аннотация

Цель: оценка влияния орально-буккальной провокационной пробы с аллергеном на слизистую оболочку рта путем измерения процента прироста общей пероксидазной активности и жизнеспособности нейтрофилов ротовой жидкости.

Материалы и методы: обследовано 22 больных атопической бронхиальной астмой и 16 здоровых добровольцев контрольной группы. Определяли общую пероксидазную активность ротовой жидкости до и после орально-буккальной провокационной пробы с аллергенами клеща *Dermatophagoides pteronyssinus* и цитотоксический эффект аллергена на жизнеспособность нейтрофилов ротовой жидкости.

Результаты и выводы: обнаружено достоверное снижение процента жизнеспособных нейтрофилов в ротовой жидкости больных атопической бронхиальной астмой после орально-буккальной провокационной пробы с аллергеном клеща *Dermatophagoides pteronyssinus*, сопровождаемое одновременным повышением общей пероксидазной активности ротовой жидкости, что указывает на вовлеченность нейтрофилов в реализацию аллергического воспаления при атопической бронхиальной астме.

Ключевые слова

Аллергия, бронхиальная астма, ротовая жидкость, нейтрофилы, общая пероксидазная активность.

Summary

Objective: to assess the effect of oral-buccal provocative test with the allergen on the oral mucosa by measuring the percentage of increase in the level of peroxidase activity and the viability of neutrophils in the oral fluid.

Materials and methods: 22 patients with atopic bronchial asthma and 16 healthy volunteers of the control group were examined. The level of peroxidase activity of the oral fluid was determined before and after the oral-buccal provocative test with the *Dermatophagoides pteronyssinus* mite allergen and the cytotoxic effect of the allergen on the viability of the neutrophils in the oral fluid.

Results and conclusions: a significant decrease in the percentage of viable neutrophils in the oral fluid of patients with atopic bronchial asthma after an oral-buccal provocative test with allergens of *Dermatophagoides pteronyssinus* mite was observed, accompanied by a simultaneous increase in the level of peroxidase activity in the oral fluid, which indicates the involvement of neutrophils in the realization of allergic inflammation in atopic bronchial asthma.

Keywords

Allergy, bronchial asthma, mouth fluid, neutrophils, peroxidase activity.

Введение

В аллергическом воспалении участвуют лейкоциты врожденной системы иммунитета: тучные клетки, нейтрофилы и эозинофилы. На поверхности этих клеток расположены Fc-рецепторы для IgE, благодаря чему они могут связывать эти

антитела. В частности, нейтрофилы больных аллергией экспрессируют низкоаффинные FcεRII и высокоаффинные FcεRI рецепторы, которые связывают IgE. Следствием взаимодействия IgE-антител с аллергеном является дегрануляция нейтрофилов. Происходит выброс миелоперок-

сидазы, эластазы и прочих ферментов. Данный феномен лег в основу диагностических тестов для больных аллергией: реакции выброса миелопероксидазы нейтрофилами *in vitro* [1] и орально-буккальной провокационной пробы с аллергеном [2].

С целью диагностики пищевой и лекарственной аллергии *in vivo* А.Д. Адо был разработан тест торможения естественной миграции лейкоцитов [3], в котором оценивается количество лейкоцитов в ротовой жидкости до и после воздействия на слизистую оболочку рта аллергеном (отсюда еще одно название теста — слизисто-десневой), и по уменьшению их количества судят о наличии сенсibilизации к аллергену.

В связи с этим представляет интерес поиск других вариантов выявления сенсibilизации лейкоцитов к аллергенам для диагностики аллергии после контакта слизистой оболочки рта с аллергеном.

Целью данного исследования была оценка влияния орально-буккальной провокационной пробы с аллергеном на слизистую оболочку ротовой полости путем определения общей пероксидазной активности и жизнеспособности нейтрофилов ротовой жидкости для подтверждения сенсibilизации организма к аллергену клеща *Dermatophagoides pteronyssinus* при atopической бронхиальной астме.

Материалы и методы

Обследовано 22 пациента с верифицированным путем аллергологического обследования диагнозом atopической бронхиальной астмы с сенсibilизацией к клещу *Dermatophagoides pteronyssinus*. Возраст пациентов от 16 до 54 лет, из них 4 мужчины и 18 женщин, поступившие для плановой специфической иммунотерапии в отделение аллергологии Витебской областной клинической больницы в период ремиссии. В контрольную группу включили 16 взрослых здоровых лиц-добровольцев. Эти группы типа случай-контроль были адекватны по демографии. Всеми участниками исследования, было дано информированное согласие в письменной форме.

Все пациенты обследовались натощак и без чистки зубов накануне исследования. За 12 часов до забора ротовой жидкости пациенты не употребляли алкоголь, не принимали никаких лекарственных средств, не курили и не употребляли в пищу продукты с высокими аллергенными свойствами.

Предварительно [4] было установлено, что минимальной вызывающей эффект при орально-буккальном провокационном тесте является концентрация аллергена клеща *Dermatophagoides pteronyssinus* 100 PNU. Общая пероксидазная активность и жизнеспособность нейтрофилов ротовой жидкости оценивались через 30 минут и 24 часа после воздействия аллергена на слизистую оболочку.

Орально-буккальная провокационная проба. У пациентов натощак собирали ротовую жидкость в пробирку Эппендорф, после чего в течение 2 минут они прополоскивали рот 10 мл физиологического раствора. Полученный смыв собирался в стандартные пробирки. Затем пациенты в течение 2 минут полоскали рот 10 мл раствора аллергена клеща *Dermatophagoides pteronyssinus* (Биомед, Россия) в концентрации 100 PNU. Через 30 минут и 24 часа повторно брали ротовую жидкость в пробирки Эппендорф и смыв ротовой полости в стандартные пробирки. В этой ротовой жидкости определяли общую пероксидазную активность, кроме того из смыва выделяли нейтрофилы и оценивали их жизнеспособность.

Измерение общей пероксидазной активности ротовой жидкости. При выполнении работы соблюдали уже существующую методику [2]. Собранную ротовую жидкость фильтровали через нейлоновый фильтр, затем центрифугировали при 10000 об./мин в течение 10 минут. Образцы надосадочной жидкости в объеме 100 мкл переносилась в лунки стандартного полистиролового плоскодонного планшета для ИФА-исследований. Следующим этапом добавляли 100 мкл раствора тетраметилбензидина, с экспозицией 10 мин при 20°C в темноте. Затем реакцию останавливали, добавляя 100 мкл 0,9М раствора H₂SO₄. Спектрофотометрию проводили в ИФА-анализаторе с длиной волны 450 нм. Измерения выражали в единицах оптической плотности (ЕОП). Ранее [5] было показано, что при определении общей пероксидазной активности единицы оптической плотности прямо и сильно коррелируют с концентрацией миелопероксидазы.

Выделение нейтрофилов и оценка цитотоксического эффекта аллергена. Данная процедура выполнялась согласно методике [6]. Смывы центрифугировали при 3000 об./мин в течение 5 минут, в результате чего получали осадок, содержащий лимфоциты, гранулоциты и эпителиальные клетки. Нейтрофилы выделяли из смывов путем центрифугирования в градиенте плотности. Готовился раствор фиколл-гипака плотностью 1,077 г/л. Полученный раствор фиколл-гипака поме-

щали в центрифужную пробирку в объеме 1 мл, после чего наслаивали 2 мл ресуспензированного осадка, полученного после центрифугирования смыва. Смесь центрифугировали при 1000 об./мин в течение 2 минут, что приводило к выделению лимфоцитов в промежуточной фазе в виде кольца, а гранулоциты оседали на дно пробирки.

Полученный осадок ресуспензировали, переносили в объеме 100 мкл в пробирку Эппендорф, после чего к взвеси добавлялся 0,1% раствор трипанового синего в объеме 100 мкл. Окрашенную суспензию переносили в камеру Горяева, где проводился подсчет окрашенных (мертвых) и неокрашенных (жизнеспособных) нейтрофилов из расчета на 100 клеток [6]. Цитотоксический эффект считали положительным при увеличении числа окрашенных нейтрофилов в пробах с аллергеном *Dermatophagoides pteronyssinus* на 15%.

Статистический анализ. Расчеты проводились в программах Statistica 10.0 и MS Excel. Для расчета порога отсечения использовали ROC-анализ. Так как данные имели ненормальное частотное распределение, для выявления достоверности различий применяли непараметрический критерий Вилкоксона с указанием уровня достоверности расчета ($p < 0,05$).

Результаты исследования

Установлено, что в результате орально-буккального провокационного теста с аллергеном клеща *Dermatophagoides pteronyssinus* у пациентов опытной группы достоверно возрастала общая пероксидазная активность ротовой жидкости. Статистически значимого изменения общей пероксидазной активности ротовой жидкости в контрольной группе не отмечалось (таблица 2).

Одновременно было обнаружено, что процент жизнеспособных нейтрофилов в ротовой жидкости спустя 24 часа после орально-буккальной провокационной пробы достоверно снижается в опытной группе, при этом статистически значимых изменений количества живых нейтрофилов в группе контроля не было (таблица 3).

По результатам ROC-анализа установлено, что диагностическим критерием для положительного теста составляет снижение количества жизнеспособных нейтрофилов на 7%. Чувствительность метода 83,3%, специфичность 90,5%, $p < 0,05$, $AUC = 0,81$.

Диагностическим критерием положительной реакции является повышение общей пероксидазной активности ротовой жидкости на 7%. Чувствительность метода 100%, специфичность 91%, $p < 0,05$, $AUC = 0,98$.

Таблица 2. Общая пероксидазная активность ротовой жидкости (в единицах оптической плотности) пациентов двух групп до и после орально-буккальной провокации

	До провокации М [-ДИ; +ДИ]	После провокации М [-ДИ; +ДИ]		Средний прирост через 24 часа, %
		Через 20 минут	Через 24 часа	
Опытная группа (n=22)	1,3 [0,93; 1,67]	1,38 [0,92; 1,81]	1,57 [1,24; 1,9]*	25,1
Контрольная группа (n=16)	1,16 [0,79; 1,53]	1,15 [0,84; 1,42]	1,1 [0,72; 1,47]	-5,2

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

Таблица 3. Процент жизнеспособных нейтрофилов в ротовой жидкости пациентов двух групп до и после орально-буккального провокационного теста

	До провокации М [-ДИ; +ДИ]	После провокации М [-ДИ; +ДИ]		Средний прирост через 24 часа, %
		Через 20 минут	Через 24 часа	
Опытная группа (n=22)	76 [64,4; 87,7]	73,5 [61,4; 85,3]	57,5 [45,5; 69,6]*	-23,6
Контрольная группа (n=16)	69,4 [56,1; 82,6]	69,2 [50,7; 80,4]	69,3 [55,7; 80,3]	1,02

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

Обсуждение

Тест торможения естественной миграции лейкоцитов по А. Д. Адо применяют более 25 лет [3]. В нем оценивают общее число нейтрофилов в ротовой жидкости до и после взаимодействия слизистой оболочки рта с аллергеном. В цитотоксическом тесте, использованном в настоящем исследовании, подсчитывался процент жизнеспособных нейтрофилов в ротовой жидкости после орально-буккальной провокации с причинным аллергеном клеща *Dermatophagoides pteronyssinus*.

Обнаружено, что в результате цитотоксического теста у больных атопической бронхиальной астмой происходит достоверное снижение процента жизнеспособных нейтрофилов спустя 24

часа после воздействия аллергена на слизистую оболочку. Факт того, что пероксидазная активность ротовой жидкости у этих же больных возрастает, позволяет сделать вывод о вовлеченности нейтрофилов в реализацию аллергического воспаления у больных атопической бронхиальной астмой. Орально-буккальная провокационная проба с аллергеном и оценкой прироста пероксидазной активности и жизнеспособности нейтрофилов может быть применена для диагностики аллергических заболеваний.

Выводы

1. У больных атопической бронхиальной астмой с сенсibilизацией к клещу *Dermatophagoides*

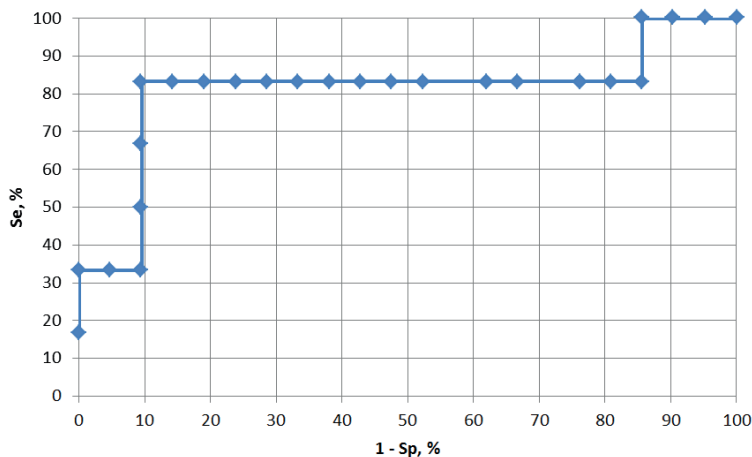


Рис. 1. Диагностический критерий процента жизнеспособных нейтрофилов в ротовой жидкости после орально-буккальной провокационной пробы.

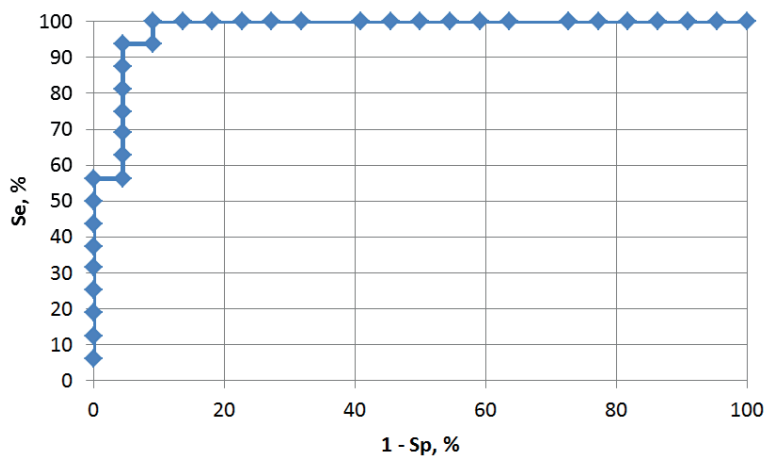


Рис. 2. Диагностический критерий общей пероксидазной активности ротовой жидкости после орально-буккальной провокационной пробы.

pteronyssinus спустя 24 часа определяется достоверное увеличение пероксидазной активности ротовой жидкости после орально-буккальной провокационной пробы с этими аллергенами по сравнению с контрольной группой. Одновременно у этих больных обнаружено снижение числа жизнеспособных нейтрофилов в ротовой жидкости после этой пробы по сравнению с контролем.

2. Результаты указывают на участие нейтрофилов в реализации аллергической реакции после провокационной пробы с аллергенами на слизистую оболочку ротовой полости.
3. Орально-буккальная проба с аллергеном может быть использована в качестве неинвазивного метода диагностики atopической бронхиальной астмы.

Литература

1. Новиков П. Д., Новикова Н. Д. Диагностика аллергии в реакции выброса миелопероксидазы под влиянием аллергена. Иммунопатология, аллергология, инфектология 2002; №1: 61-68.
2. 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.
3. Хаитов Р. М., Ильина Н. И. Аллергология и иммунология: национальное руководство. ГЭОТАР-Медиа, 2014, 656 с.
4. Щурок И.Н., Новиков Д.К. Диагностика фенотипов аллергического ринита. Иммунопатология, аллергология, инфектология 2018; №3: 69-77.
5. Карпук И. Ю. Увеличение уровня миелопероксидазы в ротовой жидкости после орально-буккальной провокации с компонентами стоматологических материалов у пациентов с их непереносимостью. Рос. иммунол. журн. 2017; Т.11, №4: 57-64
6. Новиков Д. К., Новикова В. И. Клеточные методы иммунодиагностики. Мн.: Беларусь, 1979, 222 с .

Сведения об авторах:

Москалев И.К. – аспирант кафедры клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПК Витебского государственного медицинского университета.
Щурок И.Н. – ассистент – аспирант кафедры клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПК Витебского государственного медицинского университета.
Новиков Д.К. – зав. кафедрой клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПК Витебского государственного медицинского университета.

Поступила 16.08.2018 г.