

## Биомаркеры ротовой жидкости после провокационной орально-фарингеальной пробы с аллергеном для диагностики атопической бронхиальной астмы

И.Н. Щурок

Витебский государственный медицинский университет, Витебск, Беларусь

### Biomarkers of oral fluid after oral-pharyngeal provocative test with allergen for the diagnosis of atopic bronchial asthma

I.N. Shchurok

Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus

#### Аннотация

**Цель.** Определение изменений ферментативной активности ротовой жидкости под влиянием аллергена путем проведения орально-фарингеальной пробы (ОФП) с водно-солевым экстрактом аллергена клеща *Dermatophagoides pteronyssinus* для диагностики аллергии.

**Материал и методы.** Обследовали 27 пациентов с верифицированным диагнозом атопической бронхиальной астмы и 15 здоровых без аллергопатологии. Участникам исследования проводили орально-фарингеальную провокационную пробу с аллергеном *Dermatophagoides pt.* В ротовой жидкости, взятой через 30 мин и 24 часа, определяли иммуноферментным методом уровень триптазы, эозинофильного катионного белка, миелопероксидазы и нейтрофильной эластазы.

**Результаты.** Уровень триптазы повышался у пациентов с атопической бронхиальной астмой (АБА) через 30 мин до 7,98 нг/мл и нормализовался через 24 часа. Диагностическим пороговым значением прироста уровня триптазы через 30 минут после провокационной орально-фарингеальной пробы с аллергеном является 7,87 нг/мл. Прирост уровня эозинофильного катионного белка был выявлен у 23(86%) пациентов через 30 мин. До провокации уровень ЕСР составил 678,9 [580,2; 777,6] пг/мл, а после провокации 829,6 [697,9; 961,2] пг/мл,  $p=0,003$ . Диагностическое пороговое значение уровня эозинофильного катионного протеина после ОФП 413,83 пг/мл. Уровень миелопероксидазы у пациентов с атопической БА был достоверно выше, чем у здоровых и составил 112,5 [91,5; 133,4] нг/мл и 100,2 [88,7; 109,4] нг/мл соответственно ( $p=0,04$ ). Диагностическим пороговым значением уровня миелопероксидазы через 30 минут после ОФП является 99 нг/мл и через 24 часа 97,3 нг/мл. Определение прироста уровня нейтрофильной эластазы после проведения провокационной орально-фарингеальной пробы с аллергеном имеет диагностическое значение только через 24 часа и порого-

#### Summary

**Aim of study:** Determination of changes in the enzymatic activity of the oral fluid under the influence of an allergen through an oral-pharyngeal test with the allergen mite *Dermatophagoides pteronyssinus* for the diagnosis of allergy.

**Material and methods.** The study included 27 patients with allergic asthma and 15 healthy patients without allergy pathology. Oral-pharyngeal challenge test with the allergen mite *Dermatophagoides pt* was performed on all study participants. In the oral fluid taken after 30 minutes and 24 hours, the level of tryptase, eosinophilic cationic protein, myeloperoxidase and neutrophilic elastase were determined by ELISA.

**Results.** The level of tryptase increased in patients with allergic asthma after 30 minutes to 7.98 ng / ml and returned to normal after 24 hours. The diagnostic criterion for level of tryptase 7.87 ng / ml. An increase in the level of eosinophilic cationic protein (ECP) was detected in 23 (86%) patients after 30 minutes. Before provocation, the level of ECP was 678.9 [580.2; 777.6] pg / ml, and after provocation 829.6 [697.9; 961.2] pg / ml,  $p = 0.003$ . The level of myeloperoxidase in patients with asthma was significantly higher than in healthy ones and amounted to 112.5 [91.5; 133.4] ng / ml and 100.2 [88.7; 109.4] ng / ml, respectively ( $p = 0.04$ ). The diagnostic criterion for level of myeloperoxidase after 30 minutes is 99 ng / ml and after 24 hours- 97.3 ng / ml. The determination of the increase in the level of neutrophil elastase after conducting a oral-pharyngeal provocative test with an allergen has a diagnostic value only after 24 hours and the criterion according to the calculations of ROC analysis is 34.15 ng / ml. In patients with atopic bronchial asthma, the mean level of K + in the oral fluid before provocation was  $65.8 \pm 2.37$  mg / l, and after —  $76.5 \pm 1.92$  mg / l. The diagnostic criterion for level of K + after 30 minutes was 72 mg / l.

**Conclusion:** The determination level of enzymes in the oral fluid after a provocative oral-pharyngeal test is a non-invasive

вое значением по расчетам ROC-анализа составляет 34,15 нг/мл. У пациентов с atopической бронхиальной астмой средний уровень К+ в РЖ до постановки ОФП составил  $65,8 \pm 2,37$  мг/л, а после  $76,5 \pm 1,92$  мг/л. Диагностическое пороговое значение уровня калия после провокационной орально-фарингеальной пробы 72 мг/л.

**Выводы:** Определение уровня ферментов в ротовой жидкости после провокационного орально-фарингеального теста является неинвазивным и информативным методом диагностики аллергических заболеваний верхних дыхательных путей. Прирост биомаркеров указывает на специфическую гиперчувствительность СОПР к аллергену.

### **Ключевые слова**

Бронхиальная астма, орально-фарингеальная проба, аллерген, ферменты ротовой полости.

### **Введение**

При воздействии аллергена на слизистую оболочку пациентов, имеющих сенсibilизацию к данному аллергену, развивается реакция гиперчувствительности [1, 2]. Определение специфичности данного процесса определяется возможным только при верификации специфических медиаторов, которые выделяются клетками системы иммунитета под воздействием аллергена. Провокационная орально-фарингеальная проба (ОФП) отражает реальную ситуацию, происходящую при контакте ингаляционных аллергенов со слизистой оболочкой ротовой полости [2, 3, 4].

Патогенетические механизмы аллергии полиморфны. Они включают в себя IgE-зависимые и IgE-независимые, аллергенспецифические гранулоцитопосредованные и лимфоцитарные реакции. Сюда же относят неспецифическую гиперчувствительность, реализуемую через ряд медиаторов: гистамин, серотонин, лейкотриены и пр. Известно, что на тучных клетках, нейтрофилах, эозинофилах имеются рецепторы к IgE, поэтому необходимо изучение всего спектра ферментов, которые выделяются при аллергических реакциях в разные промежутки времени [2, 5].

Нами ранее были произведены исследования медиаторной активности назального лаважа при проведении провокационной назальной пробы с аллергеном клеща у пациентов с аллергическим ринитом. Специфичность дегрануляции клеток подтверждалась корреляцией с уровнем IgE антител, также с результатами кожного тестирования [4]. Данные результаты послужили основой разработки орально-фарингеальной пробы для диагностики аллергии с определением

and informative method for diagnosing allergic diseases of the upper respiratory tract. The increase in biomarkers indicates a specific hypersensitivity of COPR to the allergen.

### **Keywords**

Asthma, oral-pharyngeal test, allergen, enzymes of oral fluid.

ферментов-медиаторов ротовой жидкости при провокации аллергеном.

Ротовая жидкость все шире используется в качестве неинвазивного легко доступного биобразца для диагностики вместо крови. Слюна человека представляет собой сложную жидкость, богатую иммунологическими компонентами, которая отражает системные концентрации в реальном времени [6, 7, 8]. Достижения в области биотехнологии позволяют нам точно измерить мельчайшие концентрации иммунологических компонентов в образцах слюны [9].

Слюна секретируется слюнными железами, которые состоят из 99% воды и 1% электролитов, белков, слизи, гормонов и антибактериальных компонентов, таких как секреторный иммуноглобулин А (sIgA) и лизоцим [9, 10]. Слюна может служить эффективным индикатором как локальной, так и системной биологической активности [11-12]. Однако уровень большинства составляющих сыворотки, присутствующих в слюне, примерно в 300–3000 раз ниже, чем в плазме крови [8].

Использование слюны в качестве инструмента измерения стало популярной альтернативой крови (золотой стандарт) [13]. В настоящее время слюна используется в основном для диагностики заболеваний пародонта и других заболеваний полости рта [5, 14]. Анализ исследований показывает, что слюна может предоставить важную клиническую и диагностическую информацию для таких заболеваний, как астма [15].

Атопическая бронхиальная астма (АБА) – это хроническое, рецидивирующее аллергическое воспалительное заболевание дыхательных путей. Приблизительно у 5–10% пациентов с астмой проявляются тяжелые симптомы, которые не-

легко контролировать с помощью применения лекарственных средств [1]. Нейтрофильная астма является основным фенотипом тяжелой астмы, при которой нейтрофилы вносят значительный вклад в обострение симптомов и ремоделирование дыхательных путей [4]. Однако роль нейтрофилов в патофизиологических механизмах, ответственных за развитие тяжелой астмы, не определена. Цитотоксические эффекты при дегрануляции нейтрофилов могут способствовать патогенезу астмы [16]. Нейтрофильная эластаза и миелопероксидаза (МРО) являются двумя основными ферментами, которые вовлечены в аллергический процесс. Считается, что МРО играет более важную роль в аллергии [3, 4].

Эозинофилы остаются предметом исследования в патогенезе аллергических заболеваний, и инвазия в ткани многочисленными эозинофилами является важной характеристикой этого типа заболеваний [9]. Определение уровня эозинофильного катионного белка имеет принципиальное значение для диагностики заболевания.

Активация базофилов и тучных клеток при аллергических реакциях ведет к выделению триптазы. Когда происходит активация тучных клеток, уровень триптазы повышается в течение 15 минут, достигая высшего уровня к 2 часам, а затем постепенно снижается за несколько дней. Определение уровня триптазы является объективным индикатором дегрануляции тучных клеток при контакте с аллергеном при наличии сенсibilизации.

Цель этого исследования — выявить биомаркеры ротовой жидкости после орально-фарингеальной провокационной пробы (ОФП) с аллергеном [19, 20, 21] для диагностики атопической бронхиальной астмы.

### Материал и методы

Работа одобрена Комитетом по этике ВГМУ. Клиническими базами исследования послужили аллергологическое отделение ОКБ и кафедра аллергологии и иммунологии. Все пациенты дали письменное информированное согласие во время проведения исследования.

Обследовали 27 пациентов с верифицированным диагнозом атопической бронхиальной астмы и 15 здоровых добровольцев без наличия аллергических реакций в анамнезе (скрининг-опросник). Диагноз атопической бронхиальной астмы (БА) был выставлен на основании аллергологического обследования (жалобы, анамнез, данные объективного обследования, спирография, положительные результаты кожного тести-

рования с бытовыми аллергенами, наличие IgE антител к аллергену клеща *Dermatophagoides pt.*). В ходе исследования наблюдалось 27 пациентов (14 мужчин и 13 женщин) с атопической бронхиальной астмой легкой степени тяжести в возрасте  $30,9 \pm 2,3$  лет. В контрольную группу включены 15 здоровых добровольцев возрастом  $21,3 \pm 0,1$  лет (3 мужчин и 12 женщин).

Для включения в опытную группу были следующие критерии: пациенты с диагнозом бронхиальная астма, атопическая форма, легкой степени тяжести вне обострения, не курящие. Для включения в контрольную группу критерием было отсутствие в анамнезе аллергического заболевания (аллергический ринита и приступов затрудненного дыхания), отрицательные результаты кожного тестирования. Критериями исключения для обеих групп были острые инфекционные заболевания верхних дыхательных путей в течение месяца, беременность, текущая иммунотерапия.

Показаниями к проведению ОФП было наличие бронхиальной астмы. Относительными противопоказаниями являются воспалительные заболевания слизистой оболочки ротовой полости (СОПР).

Всем пациентам до проведения провокационной пробы был произведен забор крови с целью определения уровня IgE антител к клещу *Dermatophagoides pt.* с помощью тест системы DR.FOOKE, REF-0529960FL, LOT-2451908FLE.

Провокационная орально-фарингеальная проба (ОФП) предварительно проводилась 5-ти пациентам с АБА с тремя образцами растворов водно-солевого экстракта аллергена клеща *Dermatophagoides pteronyssinus* с содержанием аллергена в концентрации 5 PNU, 20 PNU и 100 PNU разведенного в 10 мл физиологического раствора соответственно для определения опытным путем наиболее оптимальной рабочей концентрации.

Исследование проводилось натощак, при этом пациентам давались рекомендации по элиминации триггерных пищевых факторов, могущих влиять на результаты, в течение 12 часов до отбора биопроб.

Ранее опубликованную [4] методику отбора жидкости из оральной полости мы модифицировали, проводя ее следующим образом. Было обследовано 18 пациентов с атопической бронхиальной астмой. Первоначально ротовую жидкость собирали натощак объемом 1 мл (исходная проба С0). Затем пациенту проводили орально-фарингеальную пробу 10 мл водно-солевого раствора аллергена клеща *Dermatophagoides pt.* в



концентрации 5 PNU в течение 2 мин. Через 15 мин ротовую жидкость повторно собирали в микропробирки (проба с1). Затем орально-фарингеальную пробу проводили с 10 мл водно-солевого раствора аллергена клеща *Dermatophagoides pt.* в концентрации 20 PNU в течение 2 мин, с повторным сбором ротовой жидкости через 15 мин (проба с2). Третья провокация проводилась через 15 минут, ополаскивали рот 10 мл водно-солевого раствора аллергена клеща *Dermatophagoides pteronyssinus* в концентрации 100 PNU в течение 2 мин и собирали ротовую жидкость через 15 мин (проба с3). Затем всю собранную ротовую жидкость центрифугировали в течение 10 мин при 8000 оборотах и пропускали через нейлоновый фильтр. Критерием оценки был избран прирост пероксидазной активности в ротовой жидкости с помощью субстрат-хромогенной смеси (тетрамилбензидина с пероксидом водорода). Интенсивность окраски измеряли на фотометре при длине волны 450 нм в единицах оптической плотности. Результаты проведенного исследования показали, что диагностически значимый прирост оптической плотности наблюдался при провокации раствором, который содержал 100 PNU аллергена клеща *Dermatophagoides pt.* – у 86%(15) пациентов с atopической бронхиальной астмой, а средний прирост составил 10,3%.

Пациентам с верифицированным аллергологическим диагнозом до и после провокационной пробы проводилось спирографическое обследование. Изменений показаний оценки функции внешнего дыхания не зарегистрировано. Пациенты самостоятельно заполняли опросники для оценки уровня контроля над симптомами бронхиальной астмы, оценки качества жизни (ACT, ACQ-5).

С учетом предварительных результатов после проведения исследования с тремя концентрациями аллергена, оптимальной концентрацией для проведения орально-фарингеальной пробы была выбрана 100 PNU. Также эта концентрация обусловлена тем, что водно-солевой экстракт аллергена был разведен в физиологическом растворе в 10 мл, поэтому концентрацию, которая вызывала минимальную положительную внутрикожную пробу (10 PNU), увеличили в 10 раз в связи с тем, что площадь слизистой оболочки полости рта больше площади кожи, реагирующей на аллерген, при внутрикожном тестировании.

Орально-фарингеальная проба включала следующие этапы:

1. Сбор ротовой жидкости до проведения теста, с предшествующим 2 мин. споласкиванием 50 мл питьевой воды. Через 10 мин жидкость из полости рта в объеме 1 мл собирали в пробирки (исходная проба с0).

2. Провокационная ОФП с аллергеном клеща *Dermatophagoides pt.* в концентрации 100 PNU с ополаскиванием ротовой полости и глоточных миндалин (орально-фарингеальная проба) в течение 2 мин.

3. Сбор ротовой жидкости (проба с1) через 30 мин.

4. Сбор ротовой жидкости (проба с2) через 24 часа.

5. Подготовка ротовой жидкости к исследованию (центрифугирование при 8000 оборотов/мин., затем фильтрование через нейлоновые синтетические фильтры) и определение биомаркеров – ферментов в ротовой жидкости с помощью тест систем ELISA Kit (триптаза, миелопероксидаза, нейтрофильная эластаза, эозинофильный катионный белок). Определение ферментов производили с помощью тест систем ELISA Kit: триптазу (Cat.No E-El-H1262, Elabscience Biotechnology Inc, USA), миелопероксидазу (Cat.No SEA601Hu, Cloud-Clone Corp, USA), эозинофильный катионный белок (Cat. No. E-EL-H1379, Elabscience Biotechnology Inc, USA), нейтрофильную эластазу (Cat.No E-El-H1946, Elabscience Biotechnology Inc, USA). Уровень ионов калия в РЖ определяли пламенной фотометрией. Измерение выполняли с использованием калиевого светофильтра при максимальной чувствительности прибора.

6. Учет результатов.

После ОФП оценивали клинические симптомы. По четырехбалльной шкале оценивали интенсивность кашля: 0 – нет; 1 – редкий; 2 – умеренный (1 или несколько раз в час); 3 – постоянный. По пятибалльной шкале оценивали количество мокроты: 0 – нет; 1 – незначительное количество (до 5 мл); 2 – немного (15 мл); 3 – умеренное количество (от 30 мл до 150 мл); 4 – много (150 мл и более). Цвет и оттенок мокроты при ее наличии оценивали в 6 вариантах: 0 – мокроты нет, 1 – есть, но бесцветная; 2 – бледно-желтая; 3 – светло-желтая; 4 – светло-желтая/зеленая; 5 – темно-желтая/зеленая.

Для оценки данных аускультация была выбрана 4-балльная шкала, где: 0 – дыхание везикулярное без хрипов; 1 – жесткое без хрипов; 2 – жесткое с единичными сухими хрипами, 3 – жесткое с рассеянными сухими хрипами.

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 ( $p < 0,05$ ). К результатам, имеющим нормальное распределение, применяли критерий Стьюдента ( $p < 0,05$ ). Корреляция рассчитывали по коэффициенту ранговой корреляции Спирмена.

### Результаты и обсуждение

Ранее нами были опубликованы результаты влияния орально-буккальной провокационной пробы с аллергеном на слизистую оболочку рта путем измерения процента прироста общей пероксидазной активности и жизнеспособности нейтрофилов ротовой жидкости [8]. Полученные результаты потребовали расширения наших исследований с целью выявления биомаркеров для идентификации ферментов ранней и отсроченной фазы немедленных аллергических реакций. Поэтому в данном исследовании мы применяли только ИФА тест системы для определения биомаркеров с помощью моноклональных антител, что является наиболее специфичным. Мы также расширили временные промежутки воздействия аллергена с воздействием на глоточные миндалины.

Орально-фарингеальная проба при дозе аллергена 100 PNU не спровоцировала ни у одного пациента обострение состояния по субъективным данным (кашель, першение, затруднение дыхания, удушье, одышка) и объективным показателям. Объективные критерии были оценены по аускультативным данным, спирографии, пикфлоуметрии.

Объективный осмотр с аускультацией не выявил изменений в функции внешнего дыхания. Спирографических различий в группах не наблюдалось ( $p < 0,05$ ), средний показатель ОФВ1 = 97 ± 12 % не изменялся после провокации. Данные

пикфлоуметрии были в пределах нормальных значений 370±20 l/min.

До провокации уровни триптазы в ротовой жидкости достоверно не отличались в обеих группах и составили соответственно у пациентов и здоровых 7,75 [7,66; 7,83] и 7,81 [7,69; 8,00] нг/мл,  $p = 0,22$ . Результаты представлены как средние с границами доверительных интервалов. Концентрация триптазы выражена в нг/мл. При оценке результатов было выявлено, что уровень триптазы имел достоверный прирост только через 30 мин после провокации аллергеном, но не через 24 часа (таблица 1). Полученные результаты подтверждаются литературными данными, так как триптаза это маркер немедленной аллергической реакции [1] с участием тучных клеток.

Через 30 минут наблюдался прирост уровня триптазы в ротовой жидкости в группе пациентов с бронхиальной астмой. Повышение уровня триптазы с 7,75 [7,66; 7,83] до 7,98 [7,42; 8,23] нг/мл ( $p < 0,05$ ) было достоверно значимо, что не наблюдалось у здоровых добровольцев ( $p = 0,02$ ) (рис. 1 и рис. 2).

Через 24 часа прироста уровня триптазы не наблюдалось ни в одной из групп обследуемых, что подтверждает теорию о выделении триптазы при дегрануляции из тучных клеток при немедленных аллергических реакциях. Определение этого медиатора через 24 часа является нецелесообразным.

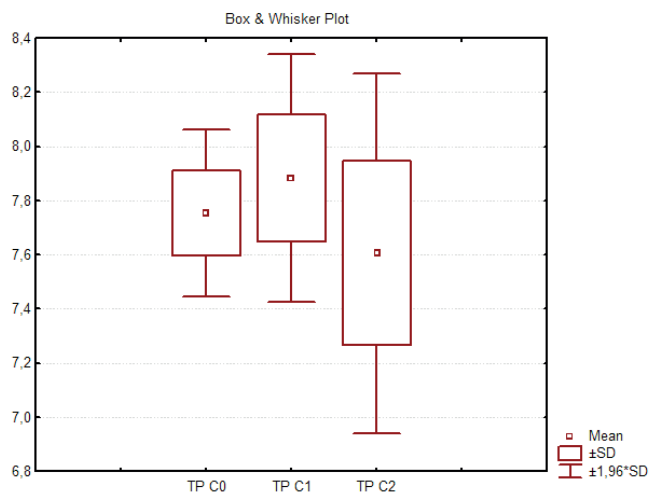
По данным ROC-анализа оптимальным пороговым значением прироста уровня триптазы через 30 минут после провокационной орально-фарингеальной пробы с аллергеном является 7,87 нг/мл (Se=68,75%; SP=76,9%; AUC=0,62  $p < 0,05$ ) (рис. 3).

Еще одним медиатором, принимающим участие в немедленных аллергических реакция, является эозинофильный катионный белок. Уровни ЕСР в ротовой жидкости до орально-фарингеальной пробы достоверно отличались в разных группах ( $p = 0,004$ ). В опытной группе уровень

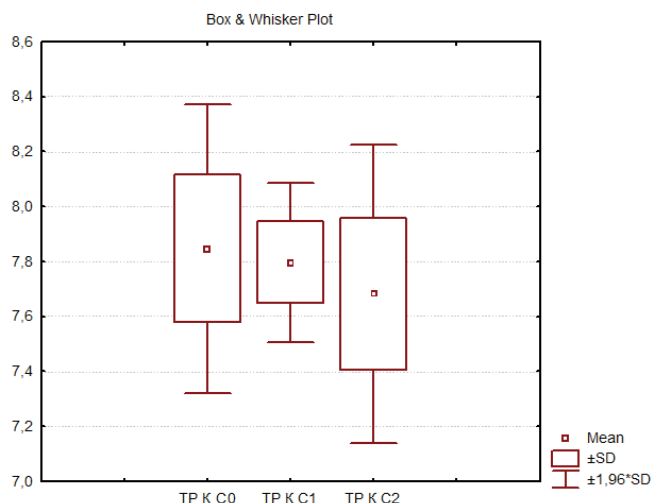
**Таблица 1. Общий уровень триптазы ротовой жидкости (в нг/мл) в опытной и контрольной группах до и после провокации**

Группы	До провокации М [-ДИ; +ДИ]	После орально-фарингеальной пробы М [-ДИ; +ДИ]	
		Через 30 минут	Через 24 часа
Пациенты с бронхиальной астмой (n=27)	7,75 [7,66; 7,83]	7,98 [7,42; 8,23] *	7,60 [7,42; 7,78]
Здоровые (n=15)	7,81 [7,69; 8,00]	7,79 [7,71; 7,88]	7,68 [7,52; 7,84]

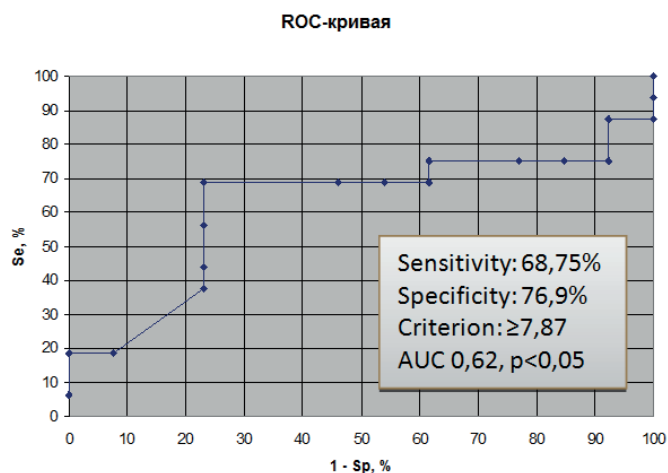
Примечание: \* $p < 0,05$  достоверные различия между группами



**Рис. 1.** Изменение уровня триптазы в ротовой жидкости у пациентов с атопической бронхиальной астмой через 30 мин (TP C1) и через 24 часа (TP C2) после орально-фарингеальной пробы.



**Рис. 2.** Изменение уровня триптазы в ротовой жидкости в контрольной группе через 30 мин (TP K C1) и через 24 часа (TP K C2) после орально-фарингеальной пробы.



**Рис. 3.** ROC анализ триптазы в ротовой жидкости через 30 минут после провокационной орально-фарингеальной пробы.

был 678,9 [580,2; 777,6] пг/мл, а в контрольной составил 356,6 [314,7; 398,5] пг/мл.

Прирост уровня эозинофильного катионного белка был выявлен у 23(86%) пациентов через 30 мин. До провокации уровень этого белка составил 678,9 [580,2; 777,6] пг/мл, а после провокации 829,6 [697,9; 961,2] пг/мл,  $p=0,003$  (рис. 4). Средний процент прироста составил 27% в группе пациентов с бронхиальной астмой. Данного прироста в группе здоровых добровольцев не наблюдалось ( $p=0,27$ ). При измерении концентрации эозинофильного катионного белка через 24 часа достоверного прироста в обеих группах не наблюдалось ( $p=0,42$ ), но у 6 пациентов с бронхиальной астмой он сохранялся на повышенном уровне. Среди лейкоцитов ротовой нейтрофилы в контрольной группе без аллергии составляют 93-95% и практически нет эозинофилов [18]. Установлено [18], что эозинофильный катионный белок нейтрофилы способны выделять, но не через 30 минут, а через 18 часов после их активации *in vitro* аллергеном через IgE антитела, связанные галектином-3, но не FcεRII рецепторами, которые имеются на нейтрофилах. Однако после орально-фарингеальной провокационной пробы нейтрофилы выделяли эозинофильный катионный белок уже через 30 минут и активность сохранялась у 6 пациентов через 24 часа. По-видимому, при взаимодействии *in vivo*, активированные тучные клетки слизистой оболочки ускоряют своими медиаторами (триптаза, гистамин и др.) реакцию нейтрофилов. Данные результаты подтверждают участие нейтрофилов за счет выделения медиаторов в слюну в развитии аллергического процесса на слизистой оболочке ротовой полости.

Диагностическое пороговое значение уровня эозинофильного катионного протеина после ОФП по данным ROC-анализа – 413,83 пг/мл ( $Se=100\%$ ;  $SP=93,3\%$ ;  $AUC=0,96$   $p<0,05$ ) (рис. 5).

Для подтверждения участия нейтрофилов в аллергических реакция, мы определяли изменение уровня миелопероксидазы в ротовой жидкости после провокации аллергеном. Исходно уровень миелопероксидазы у пациентов с atopической БА был достоверно выше, чем у здоровых и составил 112,5 [91,5; 133,4] нг/мл и 100,2 [88,7; 109,4] нг/мл ( $p=0,04$ ) соответственно. Это указывает на дегрануляцию нейтрофилов слизистой оболочки ротовой полости при atopической бронхиальной астме.

Определение миелопероксидазы в ротовой жидкости до и через 30 минут после провокационной пробы у пациентов с atopической брон-

хиальной астмой показало достоверный прирост в отличие от группы здоровых добровольцев ( $p=0,04$ ) (табл. 2).

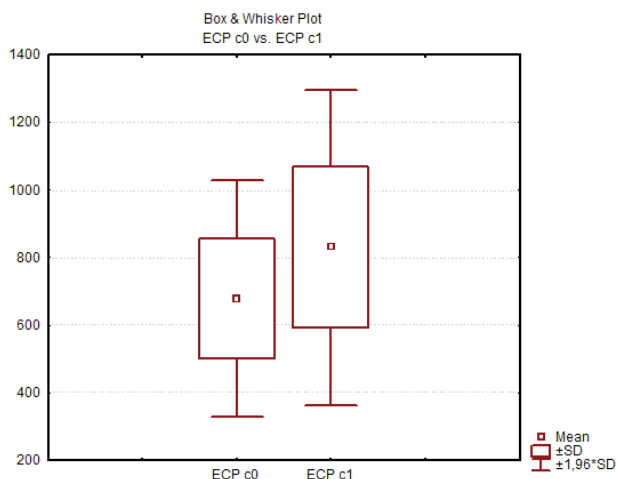
Полученные данные указывают на участие нейтрофилов в аллергических реакциях и пороговым значением уровня миелопероксидазы через 30 минут являлось 99 нг/мл ( $Se=66,7\%$ ;  $SP=100\%$ ;  $AUC=0,79$   $p<0,05$ ) (рис. 6) и через 24 часа 97,3 нг/мл ( $Se=75\%$ ;  $SP=100\%$ ;  $AUC=0,88$   $p<0,05$ ) (рис. 7).

При определении нейтрофильной эластазы в ротовой жидкости через 30 мин после провокационного теста с аллергеном клеща *Dermatophagoides pt.* достоверного изменения уровня в опытной не выявлено ( $p>0,05$ ). Исходно уровни нейтрофильной эластазы не отличались в обеих группах ( $p=0,33$ ).

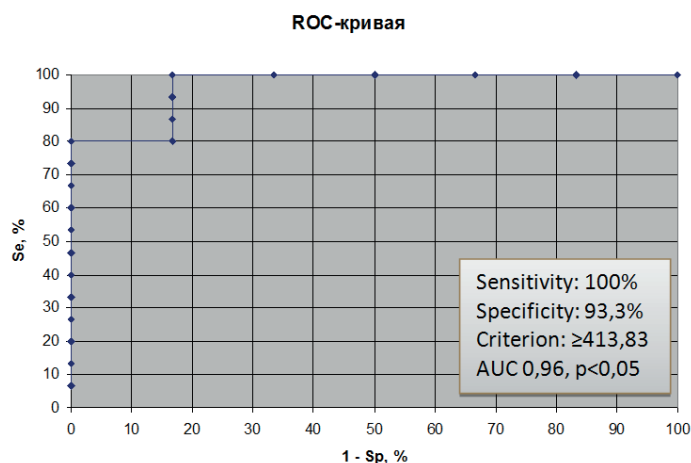
При измерении уровня нейтрофильной эластазы через 24 часа наблюдался достоверный прирост у 24 (73%) пациентов с atopической бронхиальной астмой, в отличие от контрольной группы, где прироста не наблюдалось ( $p<0,05$ ). До провокации уровень нейтрофильной эластазы в ротовой жидкости опытной группы был 28,5 [20,9; 35,9] нг/мл, а через 24 часа после орально-буккальной пробы составил 33,1 [24,5; 41,8] нг/мл. Средний прирост составил 37%. У здоровых пациентов до и после провокации составил соответственно 21 [14,8; 27,25] нг/мл и 19 [7,2; 30,8] нг/мл. Через 24 часа пороговым значением уровня эластазы в ротовой жидкости по расчетам ROC-анализа составил 34,15 нг/мл ( $Se=63,6\%$ ;  $SP=100\%$ ;  $AUC=0,78$   $p<0,05$ ) (рис. 8).

Прирост уровня нейтрофильной эластазы через 24 часа в ротовой жидкости у пациентов с atopической бронхиальной астмой после проведения провокационной орально-фарингеальной пробы с аллергеном указывает на участие нейтрофилов в аллергических реакциях через 24 часа за счет выделения фермента нейтрофильной эластазы.

Выявлена положительная высокая корреляция прироста миелопероксидазы и нейтрофильной эластазы  $R=0,7$  (коэф. Спирмена) через 24 часа. Поздний аллергический ответ связан с нейтрофильным воспалением, что также коррелирует со снижением процента жизнеспособных нейтрофилов спустя 24 часа после воздействия аллергена на слизистую оболочку. Процент снижения жизнеспособных нейтрофилов составил 23,6%, т. к. до провокации количество живых нейтрофилов было 76[64,4; 87,7] клеток, а через 24 часа после составило 57,5 [45,5; 69,6] клеток [17].



**Рис. 4.** Увеличение уровня ЕСР в ротовой жидкости у пациентов с атопической бронхиальной астмой через 30 мин (ТР С1) после орально-фарингеальной пробы.



**Рис. 5.** ROC анализ ЕСР в ротовой жидкости через 30 минут после провокационной орально-фарингеальной пробы.

**Таблица 2.** Изменение уровня миелопероксидазы ротовой жидкости (в нг/мл) в опытной и контрольной группах до и после провокации

Группы	До провокации М [-ДИ; +ДИ]	После провокации М [-ДИ; +ДИ]	
		Через 30 минут	Через 24 часа
Пациенты с бронхиальной астмой (n=27)	112,5 [91,5; 133,4]	118,7 [98,1; 139,4]*	122,9 [100,53; 145,24] *
Здоровые (n=15)	100,2 [88,7; 109,4]	101,3 [78,3; 104,8]	99,8 [88,2; 101,7]

Примечание: \*p<0,05 достоверные различия

У пациентов с верифицированным диагнозом атопическая бронхиальная астма средний уровень К+ в РЖ до ОФП составил 65,8±2,37 мг/л

(проба №1), а через 30 минут после Ц 76,5±1,92 мг/л (проба №2) (таблица 3).

Мы делаем вывод о том, что, воздействуя на СОПР, аллерген повышает уровень К+ в РЖ у



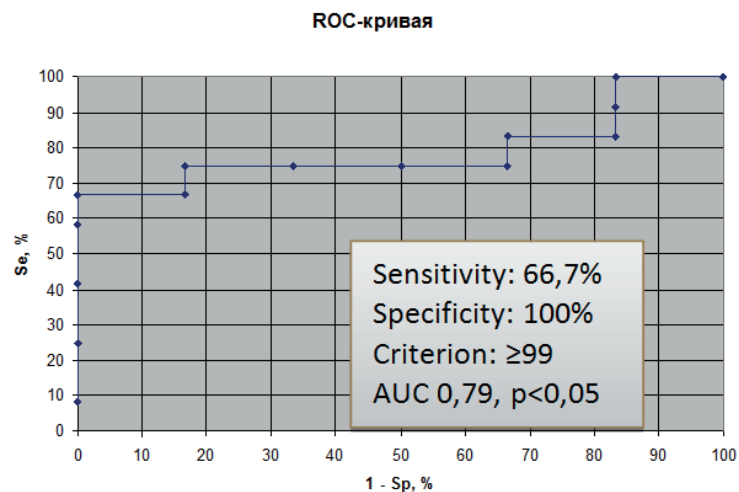


Рис. 6. ROC анализ уровня миелопероксидазы в ротовой жидкости при БА через 30 мин.

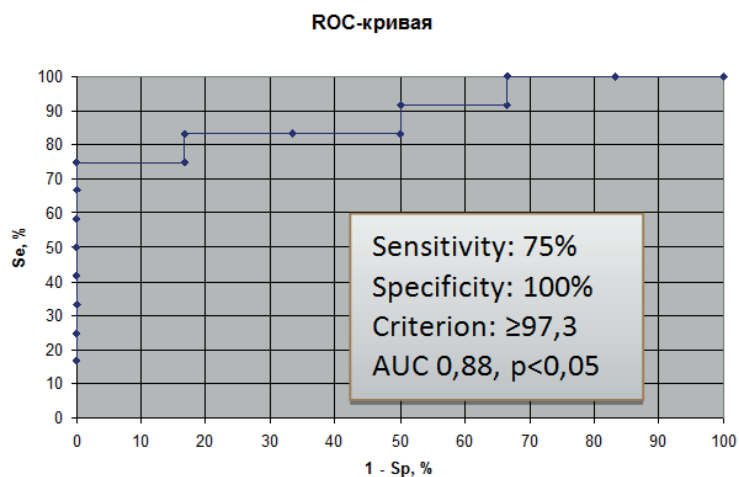


Рис. 7. ROC анализ уровня миелопероксидазы в ротовой жидкости при БА через 24 часа.

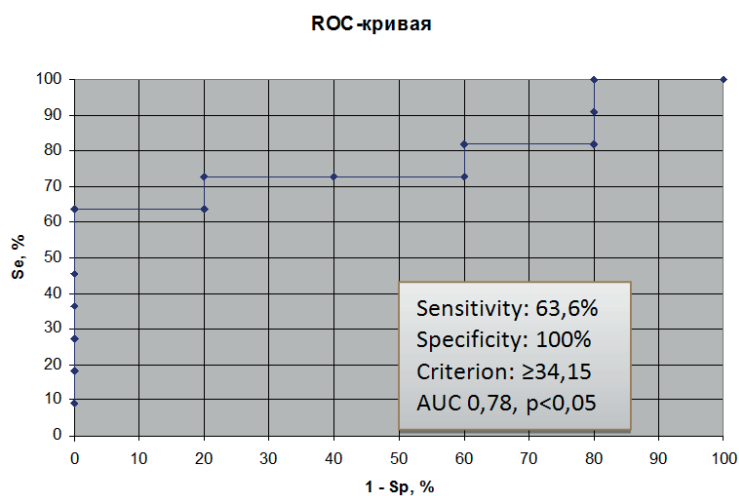


Рис. 8. ROC анализ уровня нейтрофильной эластазы в ротовой жидкости через 24 часа после провокационной орально-фарингеальной пробы в ротовой жидкости у пациентов с БА.

пациентов с atopической бронхиальной астмой, что подтверждает аллергензависимое выделение ионов калия из лейкоцитов оральной слизистой.

Уровень  $K^+$  в РЖ у пациентов контрольной группы до проведения провокационной пробы составил  $73,5 \pm 2,95$  мг/л (таблица 3), а после ОФП достоверно уменьшался -  $64,1 \pm 3,67$  мг/л.

По данным ROC-анализа оптимальное пороговое значение уровня калия после провокационной орально-фарингеальной пробы 72 мг/л при AUC 0,79, чувствительности 83,3%, специфичности 75%,  $p < 0,05$ ). Тем самым показано, что отслеживая прирост  $K^+$  в РЖ, мы можем объективно оценить как специфическую сенсibilизацию, так и локальную реактивность слизистой рта.

У больных первой группы с установленным диагнозом atopическая бронхиальная астма и

выявленной сенсibilизацией к аллергену по данным кожного тестирования уровень ионов калия в РЖ после проведения орально-фарингеальной пробы был значительно выше, чем у группы обследуемых с отсутствием данного заболевания и отрицательным результатом кожного тестирования.

Таким образом, определение уровня калия в полости рта может служить надежным биомаркером аллергической реакции у пациентов с клиническим диагнозом atopической бронхиальной астмой.

### Выводы

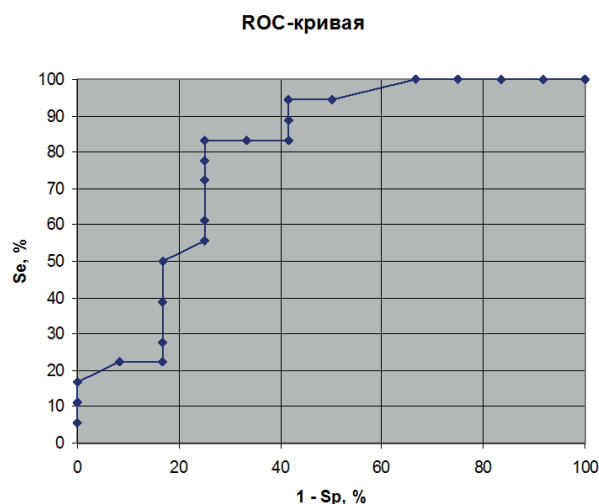
1. Диагностические возможности орально-фарингеальной пробы с аллергеном подтверждены параллельным достоверным увеличением уровней ферментов в ротовой жидкости.

**Таблица 3. Уровень ионов калия в ротовой жидкости у пациентов и здоровых до (проба 1) и после (проба 2) проведения орально-фарингеальной пробы с аллергеном**

	Проба №1	Проба №2	p
Пациенты с АБА	$65,8 \pm 2,37$ мг/л	$76,5 \pm 1,92$ мг/л	0,00002
Здоровые	$73,5 \pm 2,95$ мг/л	$64,1 \pm 3,67$ мг/л	0,00002

**Таблица 4. Диагностические значения орально-фарингеальной провокационной пробы**

	через 30 мин	Через 24 часа
Триптаза	+	-
Эозинофильный катионный протеин (ЕСР)	+	-
Миелопероксидаза	+	+
Эластаза	-	+
Оценка количества жизнеспособных нейтрофилов	-	+
Ионы калия	+	-



**Рис. 9. ROC анализ уровня ионов калия в ротовой жидкости через 30 минут после ОФП у пациентов с БА.**

2. Триптаза является медиатором немедленных аллергических реакций, поэтому определение триптазы в ротовой жидкости после провокации аллергеном имеет диагностическое значение только через 30 мин. Диагностическим пороговым значением уровня триптазы в ротовой жидкости после проведения орально-фарингеальной пробы с аллергеном является 7,87 нг/мл.
3. Увеличение эозинофильного катионного белка в ротовой жидкости через 30 мин после проведения провокационной пробы может являться диагностическим критерием участия эозинофилов в развитии аллергических реакций. Диагностическое пороговое значение уровня эозинофильного катионного протеина после провокации аллергеном - 413,83 пг/мл
4. Подтверждением нейтрофильной гиперчувствительности при развитии аллергической реакции является достоверный прирост миелопероксидазы в ротовой жидкости через 30 мин и через 24 часа. Диагностическим пороговым значением уровня миелопероксидазы через 30 минут является 99 нг/мл и через 24 часа 97,3 нг/мл.
5. Определение прироста уровня нейтрофильной эластазы после проведения провокационной орально-фарингеальной пробы с аллергеном

- имеет диагностическое значение только через 24 часа и пороговое значением по расчетам ROC-анализа составляет 34,15 нг/мл.
6. Снижение количества жизнеспособных нейтрофилов через 24 часа сопровождается достоверным увеличением прироста миелопероксидазы и нейтрофильной эластазы. Выявлена положительная высокая корреляция прироста миелопероксидазы и нейтрофильной эластазы  $R=0,7$  (коэф. Спирмена) через 24 часа.
7. У пациентов с atopической бронхиальной астмой средний уровень  $K+$  в РЖ до постановки провокационной пробы составил  $65,8 \pm 2,37$  мг/л, а после проведения провокационного орально-фарингеальной пробы  $76,5 \pm 1,92$  мг/л. Этот прирост указывает на специфическую гиперчувствительность СОПР к аллергену.
8. Определение уровня ферментов в ротовой жидкости после провокационного орально-фарингеального теста является неинвазивным и информативным методом диагностики аллергических заболеваний верхних дыхательных путей.

## Литература

1. Хайтов Р. М., Ильина Н. И. Аллергология и иммунология: национальное руководство. ГЭОТАР-Медиа, 2014, 656 с.
2. Щурок И.Н., Новиков Д.К. Диагностика фенотипов аллергического ринита. Иммунопатология, аллергология, инфектология 2018; №3: 69-77.
3. Новиков П.Д., Новикова Н.Д. Диагностика аллергии в реакции выброса миелопероксидазы под влиянием аллергена. Иммунопатология, аллергология, инфектология 2002; №1: 61-68.
4. 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.
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. Lim P.W., Garssen J., Sandalova E. Potential Use of Salivary Markers for Longitudinal Monitoring of Inflammatory Immune Responses to Vaccination. Mediators of Inflammation 2016, Article ID 6958293, 12 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/6958293>.
7. Bonne N.J., Wong D.T. Salivary biomarker development using genomic, proteomic and metabolomic approaches. Genome Med. 2012; 4: 82.
8. Yoshizawa J.M., Schafer C.A., Schafer J.J. et al. Salivary biomarkers: toward future clinical and diagnostic utilities. Clin Microbiol Rev. 2013; 26: 781-791.
9. Chiappin S., Antonelli G., Gatti R. et al. Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. Clinica Chimica Acta 2007; vol. 383, №1-2: 30Ц40.
10. Kaufman E., Lamster I.B. The diagnostic applications of saliva II a review. Critical Reviews in Oral Biology and Medicine 2002; vol. 13, no. 2: 197-212.
11. Lee Y.-H., Wong D.T. Saliva: an emerging biofluid for early detection of diseases," American Journal of Dentistry 2009; vol. 22, №4: 241Ц248.
12. Osman A., Costea D.E., Johannessen A.C. The use of salivary cytokines as a screening tool for oral squamous cell carcinoma: a review of the literature," Journal of Oral and Maxillofacial Pathology 2012; vol. 16, №2: 256-261.
13. Williamson S., Munro C., Pickler R. et al. Comparison of biomarkers in blood and saliva in healthy adults. Nursing Research and Practice 2012; vol. 2012, Article ID 246178, 4 pages.
14. Burbelo P.D., Bayat A., Lebovitz E.E. et al. New technologies for studying the complexity of oral diseases. Oral Diseases 2012; vol. 18, №2: 121-126.
15. Little F.F., Delgado D.M., Wexler P.J. et al. Salivary inflammatory mediator profiling and correlation to clinical disease markers in asthma. PLoS ONE 2014; vol. 9, №1, Article ID e84449.
16. Новиков Д.К., Новикова В. И. Клеточные методы иммунодиагностики. Мн.: Беларусь, 1979, 222 с.
17. Москалев И.К., Щурок И.Н., Новиков Д.К. Аллерген повреждает нейтрофилы слизистой оболочки рта у больных

атопической бронхиальной астмой. Иммунопатология, аллергология, инфектология 2018; №3: 55-59.

18. Monteseirín J., Vega A., Chacón P. et al. Neutrophils as a Novel Source of Eosinophil Cationic Protein in IgE-Mediated Processes. J. Immunol. August 15, 2007, 179 (4): 2634-2641. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.4.2634>.

19. Новиков Д.К., Новикова В.И. Способ определения сенсibilизации лейкоцитов: а.с. СССР №445690, 1974. Бюл. №375.

20. Янченко В.В., Новиков Д.К. Применение теста выброса ионов калия для диагностики и профилактики аллергических осложнений лекарственной терапии. Иммунопатология, аллергология, инфектология 1999; №1: 67-70.

21. Карпук И.Ю., Новиков Д.К. Выявление аллергии и гиперчувствительности к солям металлов путем определения уровня ионов калия в ротовой жидкости. Иммунопатология, аллергология, инфектология 2016; №3: 21-30.

#### Сведения об авторе:

Щурок И.Н. – ассистент кафедры клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПК.

Поступила 22.11.2018 г.