

УДК: 577.15/17

©Коллектив авторов

## НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ДИАГНОСТИКИ ПИЩЕВОЙ НЕПЕРЕНОСИМОСТИ

**Н.В. Решетова<sup>1</sup>, Н.В. Семенова<sup>1</sup>, А.А. Иванова<sup>2</sup>.**

<sup>1</sup>ГУ НИИ биомедицинской химии им В.Н. Ореховича, РАМН. 1  
19121, Москва, ул. Погодинская, д.10, факс:245-0857

<sup>2</sup>Медицинский центр ЦБ РФ.

В присутствии пищевых антигенов у пациентов с их непереносимостью наблюдается изменение метаболической активности гранулоцитов. Этот показатель изменяется у пациентов с высоким уровнем специфических IgE антител к пищевым антигенам в крови и особенно значительно при сочетании IgE- зависимого и клеточного типа реакций непереносимости.

Диагностику пищевой непереносимости проводили, оценивая изменение метаболической активности гранулоцитов в присутствии пищевых антигенов в оригинальном тесте *in vitro*.

**Ключевые слова:** диагностика пищевой непереносимости, окислительный метаболизм.

**ВВЕДЕНИЕ.** Гиперчувствительность к продуктам питания может быть обусловлена как иммунными (аллергическими), так и неиммунными механизмами непереносимости [1].

Среди иммунных можно выделить реакции, опосредованные синтезом специфических IgE и IgG антител, реакции клеточного типа, обусловленные сенсibilизацией Т-лимфоцитов к пищевому антигену и некоторые другие [2]. Хронические воспалительные процессы органов желудочно-кишечного тракта сопровождаются нарушением переваривающей и всасывающей функции кишечника и обуславливают поступление в организм крупных пептидов, выступающих в качестве полноценных антигенов и способствующих возникновению пищевой непереносимости.

В основе большинства псевдоаллергических реакций лежит гистамин-высвобождающая активность пищевых антигенов (ПА), опосредованная IgE-независимыми механизмами. Среди последних можно рассматривать повышение чувствительности тучных, базофильных и других клеток к неспецифическим раздражителям, повышение проницаемости слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта, нарушение вегетативной регуляции функций систем организма в виде повышения холино- и альфа-адренореактивности и снижение бета-реактивности [1]. Такие симптомы детской пищевой аллергии как диарея, аллергический дерматит, крапивница могут способствовать развитию атопического ринита, бронхиальной астмы. Пищевая аллергия первых лет жизни завершается в 90% случаев к 3-4 годам. У взрослых извращенные реакции на пищевые продукты могут быть обусловлены не только аллергическими или псевдоаллергическими реакциями, но и патологиями пищеварительного тракта, нарушением гепато-целлюлярного барьера, либо приемом лекарственных средств, воздействующих на пищеварительную систему [3].

## ДИАГНОСТИКА ПИЩЕВОЙ НЕПЕРЕНОСИМОСТИ

Диагностика пищевой непереносимости крайне сложна. Даже на стадии сбора анамнеза данные могут оказаться запутанными из-за кросс-реактивности, возникающей на продукты или другие аллергены, или же за счет скрытых компонентов питания, таких как красители, стабилизаторы, пищевые добавки. Для диагностики пищевой непереносимости в большинстве случаев используют двойной слепой плацебо-контролируемый тест пищевой провокации или кожные тесты с пищевыми аллергенами [2]. Однако для пациентов с тяжелыми симптомами непереносимости антигенов в анамнезе тесты *in vivo* могут быть опасны.

Методами выбора для диагностики пищевой непереносимости являются тесты *in vitro*. На сегодняшний день высокоспецифичными являются методы множественного аллоргосорбентного хемилюминесцентного анализа, с помощью которого можно выявить наличие антител класса E и IgG к пищевым антигенам. Однако при высокой себестоимости метода он позволяет обнаружить лишь часть из возможных вариантов механизмов пищевой непереносимости, но не позволяет диагностировать непереносимость клеточного типа, цитотоксические и псевдоаллергические реакции. Существуют многочисленные иммуноферментные наборы для выявления специфических IgE антител к пищевым антигенам на микропланшетах с детекцией на вертикальном фотометре и иммуноферментная методика выявления IgE на микроцеллюлозе. Трудоемкими, малоинформативными, а потому и редко используемыми в настоящее время являются такие клеточные иммунные тесты, как стимуляция лимфоцитов, торможение миграции лейкоцитов, тест определения индукции лейкотриенов [4, 5]. Все из перечисленных методов диагностики непереносимости ПА позволяют обнаружить только один из возможных механизмов развития реакции.

Целью настоящей работы является разработка метода диагностики пищевой непереносимости *in vitro*, позволяющий выявлять гиперчувствительность, в основе которой могут лежать различные механизмы аллергической и псевдоаллергической природы. Так как на конечном этапе различных типов непереносимости наблюдается высвобождение гистамина из тучных клеток, что и обуславливает большинство клинических проявлений, то обнаружение этого эффекта в присутствии ПА, по нашему мнению, и позволит проводить диагностику этой патологии.

Наиболее оправданными и информативными для выявления изменений, происходящих в организме при встрече с различными антигенами, являются методы, моделирующие процессы, максимально приближенные к условиям *in vivo*.

Методики, в которых регистрацию изменений проводят в цельной крови, а не в ее отдельных фракциях, наиболее полно отвечают этим требованиям, так как в этом случае сохраняются естественные межклеточные взаимодействия, соответствующие таковым в макроорганизме. Поэтому в такой системе возможно максимальное выявление изменений, обусловленных внесением антигена. Регистрировать же эти изменения удобно по изменению метаболизма гранулоцитов, так как именно этих клеток достаточно много в цельной крови и в ответ на различные воздействия они довольно бурно реагируют усилением или снижением генерации активных форм кислорода. Ранее нами и другими авторами было показано, что неспецифические раздражители вызывают угнетение образования активных форм кислорода лейкоцитами крови [1,6-9].

**МЕТОДИКА.** Материалом для исследования служили образцы гепаринизированной крови 24 пациентов в возрасте от 21 до 53 лет. В работе использовали лиофилизированные пищевые антигены (ПА) производства АООТ "Биомед" им. И.И.Мечникова из цельного яйца, коровьего молока, мандарина, трески, мяса свинины, говядины, курицы, пшеницы и риса. Подготовку антигенов к работе проводили в соответствии с рекомендациями производителя. У всех пациентов определяли в сыворотке наличие специфических IgE к пищевым антигенам методом множественного аллоргосорбентного хемилюминесцентного анализа. Наличие у пациента непереносимости пищевых антигенов по клеточному типу выявляли в реакции агломерации лейкоцитов.

Метаболическую активность гранулоцитов оценивали в "бурстесте" на проточном цитофлуориметре Coulter epics XL-MCL, (США). Для исследования активации дыхательного взрыва использовали коммерческие наборы "бурстест" в собственной модификации. Для этого определяли процентное количество нейтрофилов, активированных инкубацией с пищевыми антигенами в течение 30 минут. Коэффициент интенсивности активации клеток вычисляли как отношение интенсивности активации гранулоцитов, инкубированных с пищевыми антигенами, к их спонтанной интенсивности.

При анализе результатов использован критерий Стьюдента. Диагностическая информативность показателей оценивалась на основании расчетов их чувствительности, специфичности, положительной и отрицательной предиктивной ценности и диагностической эффективности.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ** Результаты исследования показателей активации гранулоцитов в "бурстесте" в группах пациентов с хорошей переносимостью ПА и гиперчувствительностью к ним представлены в табл. 1. Было исследовано влияние различных концентраций пищевых антигенов на изменение окислительного метаболизма гранулоцитов в "бурстесте". В разведении ПА 2000 PNU/мл (1 PNU=0,00001 мг белкового азота в 1 мл) статистически достоверно ( $p<0,01$ ) увеличивается процент активированных пищевыми антигенами клеток по сравнению с аналогичными пробами в концентрации 1000 PNU/мл. Показатели активации гранулоцитов при концентрации ПА 200 PNU/мл достоверно не отличаются от таковых в разведениях 2000 PNU/мл и 1000 PNU/мл. Статистически значимых отличий в интенсивности активации дыхательного взрыва гранулоцитов в присутствии ПА в разведениях 2000, 1000 и 200 PNU/мл не обнаружено.

У пациентов с непереносимостью ПА (диагностированной по повышению уровня аллергоспецифических антител к этим антигенам) наблюдается достоверное ( $p<0,01$ ) увеличение процента активированных ПА гранулоцитов (в разведении 1000 PNU/мл) по сравнению с группой пациентов без пищевой непереносимости.

Статистически достоверно ( $p<0,05$ ) возрастает и интенсивность активации окислительного метаболизма гранулоцитов пациентов с пищевой непереносимостью в пробах с ПА в концентрации 1000 PNU/мл.

Таблица 1. Исследование активации гранулоцитов пищевыми антигенами в "бурстесте".

|  | Концентрация ПА(PNU/мл) | Переносят ПА        | Не переносят ПА                  |
|--|-------------------------|---------------------|----------------------------------|
| Процент активированных гранулоцитов в присутствии ПА | 2000                    | 3,403±0,59<br>(59)  | 5,017±1,179 <sup>a</sup><br>(18) |
|  | 1000                    | 5,632±0,76<br>(18)  | 11,06±1,0*<br>(45)               |
|  | 200                     | -                   | 13,867±2,737<br>(27)             |
| Коэффициент активации гранулоцитов                   | 2000                    | 1,001±0,077<br>(59) | 1,53±0,109<br>(18)               |
|  | 1000                    | 1,134±0,128<br>(18) | 1,319±0,091**<br>(45)            |
|  | 200                     | -                   | 1,251±0,101<br>(27)              |

Примечания: звездочками указана значимость различий с контролем, "а"- по сравнению с разведением 1000 PNU/мл. В скобках - количество проанализированных проб: "а"-  $p<0,01$  \* -  $p<0,001$

\*\* -  $p<0,05$ .

### **ДИАГНОСТИКА ПИЩЕВОЙ НЕПЕРЕНОСИМОСТИ**

В случае непереносимости ПА при добавлении этого антигена в пробу в концентрации 2000 PNU/мл статистически достоверно увеличивается интенсивность активации гранулоцитов ( $p < 0,001$ ), в то время как процент активированных клеток достоверно не изменяется, хотя и обнаруживает тенденцию к возрастанию.

Таким образом, оптимальным разведением ПА для выявления непереносимости пищевых антигенов является 1000 PNU/мл, при котором статистически достоверно увеличивается как процент активированных гранулоцитов, так и интенсивность их окислительного метаболизма. В разведении ПА 2000 PNU/мл статистически достоверно возрастает интенсивность активации нейтрофилов без значимого изменения процента активированных клеток. У пациентов с непереносимостью пищевых антигенов, выявленной в тесте множественного аллергосорбентного хемилюминесцентного анализа по повышению уровня специфических IgE, в присутствии ПА наблюдается повышение метаболической активности гранулоцитов.

Полученные в "бурсттесте" с пищевыми антигенами результаты сравнивали с показателями уровня специфических IgE и реакцией аггломерации лейкоцитов с теми же антигенами. Чувствительность "бурсттеста" с ПА, рассчитанная как отношение истинно положительных (ИП) результатов теста к сумме истинно положительных и ложноотрицательных (ЛО), составила 70%.

Специфичность теста оценивалась по процентному соотношению истинно отрицательных (ИО) к сумме истинно отрицательных+ложноположительных (ЛП) результатов и составила 94%. Предсказательная ценность положительных результатов ( $ПР = ИП/(ИП+ЛП) \times 100\%$ ) составляет 95%.

Предсказательная ценность отрицательного результата =  $ИО/(ИО+ЛО) \times 100\%$  равна 83%.

Диагностическая эффективность (соотношение  $(ИП+ИО)/(ИП+ИО+ЛП+ЛО) \times 100\%$ ) составляет 76%.

Полученные для каждого пациента результаты изменения окислительного метаболизма гранулоцитов в "бурсттесте" с пищевыми антигенами разделили на следующие группы в зависимости от уровня специфических IgE и результатов реакции аггломерации лейкоцитов (РАЛ) с ПА:

1 группа: в тестах РАЛ и методом множественного аллергосорбентного анализа пищевая непереносимость не выявлена;

2 группа: уровень специфических IgE в норме, РАЛ - положительна;

3 группа: уровень специфических IgE повышен, РАЛ - отрицательна;

4 группа: повышен уровень специфических IgE и РАЛ - положительна.

Анализ изменения активности нейтрофилов в присутствии пищевых антигенов в зависимости от уровня специфических IgE и результатов реакции аггломерации лейкоцитов выявил следующее (табл.2):

1) Достоверных отличий в количестве активированных гранулоцитов и интенсивности их активации в группе пациентов с положительной реакцией аггломерации в присутствии ПА (2 группа) по сравнению с контролем (1 группа) не выявлено.

2) Не обнаружено различий по процентному количеству активированных клеток у пациентов с повышенным уровнем специфических IgE (3 группа) антител по сравнению с контролем (1 группа).

3) У больных с повышенным уровнем специфических IgE антител и положительной РАЛ (4 группа) статистически достоверно возрастает процентное содержание активированных гранулоцитов в присутствии соответствующего пищевого антигена ( $p < 0,001$ ) и интенсивность метаболического ответа на него ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контрольной группой.

4) Статистически достоверно увеличивается интенсивность активации нейтрофилов в присутствии ПА у больных с высоким уровнем специфических IgE ( $p < 0,001$ ) по сравнению с контролем.

Таблица 2. Изменение окислительного метаболизма гранулоцитов в "бурстесте" с пищевыми антигенами в зависимости от степени их непереносимости.

| Степень непереносимости (группы) | Процент активированных гранулоцитов | Коэффициент интенсивности активации гранулоцитов |
|----------------------------------|-------------------------------------|--|
| I                                | 4,897±0,792<br>(39)                 | 0,963±0,103<br>(39)                              |
| II                               | 4,783±0,857<br>(29)                 | 0,96±0,049<br>(29)                               |
| III                              | 6,537±0,525<br>(46)                 | 1,466±0,089**<br>(48)                            |
| IV                               | 11,21±1,43*<br>(18)                 | 1,452±0,157**<br>(18)                            |
| III + IV                         | 7,986±0,602*<br>(62)                | 1,508±0,074<br>(64)                              |

Примечания: звездочками указана значимость различий по сравнению с I группой:  
\* -  $p < 0,01$  \*\* -  $p < 0,001$ .

5) Интенсивность метаболического ответа гранулоцитов в присутствии ПА статистически достоверно повышается у пациентов с высоким уровнем специфических IgE и в группе больных, у которых наблюдается одновременное повышение специфических IgE антител и положительный тест РАЛ ( $p < 0,001$ ).

Как следует из полученных результатов, интенсивность метаболического ответа гранулоцитов в присутствии пищевых антигенов статистически достоверно повышена у пациентов с высоким уровнем специфических IgE или при сочетании повышения этих антител с положительным тестом РАЛ с пищевыми антигенами. В последнем случае статистически достоверно повышен и процент активированных клеток ( $p < 0,001$ ).

**ВЫВОДЫ.** В присутствии пищевых антигенов у пациентов с их непереносимостью наблюдается изменение метаболической активности гранулоцитов. Этот показатель изменяется у пациентов с высоким уровнем специфических IgE антител к пищевым антигенам в крови и особенно значимо при сочетании IgE-зависимого и клеточного типа реакций непереносимости.

Специфичность теста выявления непереносимости пищевых антигенов по изменению окислительного метаболизма гранулоцитов составляет 94%, чувствительность - 70%, диагностическая ценность - 76%.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Пыцкий В.И. (2001) Современные проблемы аллергологии, иммунологии и иммунофармакологии, 1, 354-365.
2. Некам К. (2001). Современные проблемы аллергологии, иммунологии и иммунофармакологии, 1, 124-132.
3. Sampson H. A., Sicherer S. H., Birnbaum A. H. (2001) Gastroenterology, 120, 1026-1040.
4. Дитто М., Граммер К. (2000) Аллергические болезни, диагностика и менеджмент. (Пер. с англ.) М., 274-297.
5. Principles of Internal Medicine Harrisns, New York, (1991) 1244-12475.
6. Дидковский Н.А., Решетова Н.В., Трескунов В.К., Малащенко И.К., Сарсания Ж.Ш. (1996) Тер. арх., 68, 48-53.
7. Решетова Н.В Дидковский Н.А., Литвиненко Е.Н.(1997). Клин. лаб. диагн., №5., 83-84.

---

#### ДИАГНОСТИКА ПИЩЕВОЙ НЕПЕРЕНОСИМОСТИ

---

8. Дидковский Н.А., Решетова Н.В., Трескунов В.К. (1992), Хемилюминесцентный метод диагностики непереносимости нестероидных противовоспалительных лекарственных средств. Метод. рекоменд., М.
9. Владимиров Ю.А., Шерстнев М.П. (1989) Итоги науки и техники., Серия Биофизика, 24, 19-21.

Поступила 22.04.02

#### SOME ASPECTS OF DIAGNOSTICS FOOD INTOLERANCE

*N.V.Reshetova<sup>1</sup>, N.V. Semenova<sup>1</sup>, A.A.Ivanova<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Institute of biomedical chemistry RAMS;  
Russia; 119992, street. Pogodinskaya 10, Moscow;  
fax (095) 245-0857.

<sup>2</sup>Medical Centre of bank of Russia

In the presence of food antigens causing food intolerance in patients granulocytes isolated from these patients exhibited altered oxidative metabolism. This phenomenon may be used for diagnostics of food intolerance *in vitro*.

**Key words:** Diagnostics food intolerance, oxidative metabolism.