

***Суркова Александра Анатольевна***

магистрант

ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный  
педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

г. Ульяновск, Ульяновская область

***Зимнуров Айдар Раилевич***

лаборант-исследователь, бакалавр

Научно-исследовательский центр фундаментальных  
и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии

ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный  
педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

г. Ульяновск, Ульяновская область

***Антонова Елена Ивановна***

д-р биол. наук, профессор, директор

Научно-исследовательский центр фундаментальных  
и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии

ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный  
педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

г. Ульяновск, Ульяновская область

***Фирсова Наталья Викторовна***

канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник

Научно-исследовательский центр фундаментальных  
и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии

ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный  
педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

г. Ульяновск, Ульяновская область

*DOI 10.31483/r-138831*

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПОКАЗАТЕЛЕЙ  
ИММУНОГЛОБУЛИНОВ У ДЕТЕЙ ДО ГОДА  
БОЛЬНЫХ АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ**

**Аннотация:** анализ аллергенспецифических иммуноглобулинов класса E (IgE) в сыворотке крови детей разного пола в возрасте до года как показатель развития пищевой аллергии на фоне атопического дерматита (на примере детей Ульяновской области) используя различные диагностические тест-системы.

**Ключевые слова:** аллергия, новорожденные, пищевая аллергия, дети до года, иммуноглобулин, атопический дерматит.

Пищевая аллергия в настоящее время остается серьезной проблемой здоровья детей как всемирного, так и всероссийского здравоохранения. Распространенность аллергических заболеваний во всем мире приобретает огромные масштабы [8]. Чаще всего заболевание проявляется у детей в возрасте до года и в период с 7 до 10 лет, независимо от пола, заметно увеличиваются тяжелые формы аллергических реакций [3]. Высокий уровень заболеваемости, начало в раннем возрасте, частые рецидивы и устойчивость к традиционным методам лечения делают вопросы изучения причин возникновения атопического дерматита (АД) особенно важными. Причины развития заболевания до конца не ясны, но предполагается, что в его основе лежит несколько факторов – нейроэндокринные расстройства, нарушения в работе калликреин-кининовой системы, изменения в продукции и механизме действия катехоламинов, а также нарушения в функции и синтезе Ig [7]. Патогенез АД является многокомпонентным процессом, хотя главную роль в развитии заболевания играют сбои в работе иммунной системы. Пусковым механизмом иммунного ответа при АД является взаимодействие аллергенов с IgE-антителами на поверхности тучных клеток и базофилов [2].

Интерес к проблеме аллергопатологии у детей раннего возраста растет не только в связи с распространенностью, но и по причине отсутствия единого подхода к терапии, данная проблема усугубляется недостатком лекарственных антигистаминных препаратов, которые разрешены для приема детям в возрасте до 1 года, в связи с этим данная группа пациентов получает только в основном симптоматическую терапию [1]. Учитывая глобальные техногенные изменения

в окружающей среде, дебют аллергической патологии, отмечается уже в раннем возрасте. Сегодня хорошо известно, что отправной точкой «аллергического марша» является пищевая аллергия. Рацион питания играет важную роль в становлении здоровья человека на всех этапах детства. Но особенно значимо питание для беременной и кормящей женщины в период, когда ребёнок находится в утробе, и в первые два года после рождения [5].

Среди факторов, которые могут объяснить рост распространенности пищевой аллергии в последние десятилетия, в первую очередь следует отметить изменение колонизации микроорганизмами кишечника новорожденных детей за счет отсроченного первого прикладывания к груди матери, докорма молочными формулами в первые часы и дни жизни, ранний перевод на искусственное вскармливание. При этом отмечаются увеличение частоты тяжелых аллергических реакций и все более раннее начало клинических проявлений. Согласно современным представлениям, персонализированный подход к диагностике, диетотерапии и фармакотерапии аллергических заболеваний у детей предусматривает проведение генетических исследований, позволяющих прогнозировать развитие и течение этих болезней, а также эффективность профилактических и лечебных мероприятий. В связи с этим проведение своевременной и квалифицированной диагностики аллергопатологий становится наиболее актуальным. Определение специфических иммуноглобулинов на сегодняшний день одна из основных диагностик пищевой аллергии и АД [8]. Выявление и количественное определение концентрации свободных аллерген-специфичных IgE имеет большое значение при диагностике и исследовании аллергических заболеваний, для выбора адекватной терапии.

В связи с этим *целью* данной работы является анализ методом ИФА аллергенспецифических иммуноглобулинов класса E (IgE) в сыворотке крови детей разного пола в возрасте до года как показатель развития пищевой аллергии при АД (на примере детей Ульяновской области) используя различные диагностические тест-системы (ДТС).

*Материалы и методы.* Для решения поставленных задач по анализу методом ИФА содержания аллергенспецифических иммуноглобулинов класса Е в сыворотке крови (IgE-антител) детей в возрасте до года использовали в сравнительном аспекте ДТС разных производителей. Материалом для исследования служила сыворотка крови детей мужского и женского пола в возрасте от 3 месяцев до 1,4 года. Материал забирали в вакуумные пробирки с активатором свертывания в объеме 4 мл. На стенки для ускорения свёртывания крови нанесён активатор образования сгустка (SiO<sub>2</sub>-диоксид кремния, также называется клот активатор, clot-activator, AC, кремнезем), который обеспечивает разделение сыворотки и сгустка до 48 ч без повторного центрифугирования. Затем кровь центрифугировали на центрифуге Allegra X-30R Centrifuge (Beckman Coulter, США), при ускорении 2000–3000 об/мин ротора в течение 15 мин. После центрифугирования отделяли сыворотку для дальнейшего исследования.

В работе использовали две ДТС, условно названные «ДТС №1» и «ДТС №2» разных производителей. Тест системы отличались по этапу пробоподготовки и пределу чувствительности. Работу с наборами ДТС проводили согласно инструкциям производителя.

В каждом образце сыворотки пациента определяли уровень IgE на аллергены:

– домашнюю пыль – в состав которой входят различные аллергены – клещи семейства *Pyroglyphidae*, аллергены животного происхождения (перхоть, перья, шерсть, остатками выделений домашних животных и человека), растительного происхождения (пыльца растений, остатки тканей, одежды, постельного белья), микробного и грибкового происхождения (споры, тела и токсины различных грибов и бактерий) и библиотечная пыль (пылевые частички);

– нативное куриное яйцо – аллергенами нативного куриного яйца являются белки яичного белка, которые могут проявлять аллергенную активность (овальбумин, овомукоид, кональбумин, лизоцим). В желтке также есть IgE-связывающие аллергены, но они обладают значительно меньшей клинической значимостью;

– сорные травы – к аллергенам сорных трав относятся пыльца растений нескольких семейств: маревые, сложноцветные, подорожниковые (амброзия полыннолистная, полынь обыкновенная, марь белая, подорожник, чертополох русский). Аллергены пыльцы сорных трав похожи по своей структуре на аллергены домашней пыли, поэтому довольно часто аллергия на них может встречаться одновременно у одного человека.

Определение IgE в сыворотке крови проводили методом ИФА на ImmunoChem-2100 HTI (High Technology, США), в основе которого лежит специфическая реакция антиген-антитело. Выявление образовавшегося комплекса проводят с использованием фермента в качестве метки для регистрации сигнала. В работе использовали 96-ти луночные полистирольные планшеты. Чувствительность метода (минимальное выявляемое количество антител или антигена) определяется следующими факторами:

- аффинность антител – предпочтительнее использование моноклональных антител;
- специфическая активность фермента;
- интенсивностью сигнала;
- чувствительностью учета сигнала.

В общей сложности исследования проведены в биологическом материале 21 человека – дети до года мужского (10 человек) и женского пола (11 человек), в возрасте от 3 месяцев до 1,4 года.

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программ Microsoft Excel и GraphPad Prism 10 для статистической обработки с определением среднеарифметического значения и среднеквадратичного отклонения ( $\text{Mean} \pm \text{StD}$ ) с разделением по полу и по группе, а также уровня значимости относительно референсного значения ( $p$ -value).

*Результаты и их обсуждение.* IgE участвуют в возникновении и развитии аллергических реакций. Эти антитела, связывая аллерген, приобретают способность стимулировать выделение базофилами ряда вазоактивных веществ, которые определяют развитие аллергической симптоматики.

Использование в работе «ДТС №2» выявило, что есть ограничения по использованию набора. Так, в частности, отрицательный результат анализа на аллерген-специфический IgE против антибиотиков пенициллина G, пенициллина V, цефалоспорины, ампициллина и амоксициллина не исключает наличия клинической гиперчувствительности к данным аллергенам.

По всей видимости данное заключение связано с тем, что возникновением аллергической реакцией, по 2 типу – не-IgE-опосредованная/зависимая пищевая аллергия или с нарушением процедуры забора образцов крови (до появления специфических IgE в циркуляции или после падения их концентрации). Отрицательный результат анализа на аллерген-специфический IgE против пищевых аллергенов не исключает возможности последующего развития клинической гиперчувствительности по отношению к этим аллергенам.

Также необходимо учитывать, что IgE, специфичные к конкретному аллергену, могут связывать другие схожие по структуре аллергены (например, луговые травы и томат). Это обусловлено наличием общих антигенных детерминант в аллергенах различного происхождения. При постановке диагноза эти обстоятельства должны приниматься во внимание.

При сравнении уровня чувствительности «ДТС №1» и «ДТС №2» (рис. 1) нами выявлено, что на аллерген-специфический IgE на аллергены домашней пыли из 21 проведенного анализа чувствительность совпала в 6 случаях, в одном результате расхождение на 2 единицы, в 14-ти расхождение результатов на единицу. По уровню чувствительности «ДТС №2» выше в сравнении с «ДТС №1».

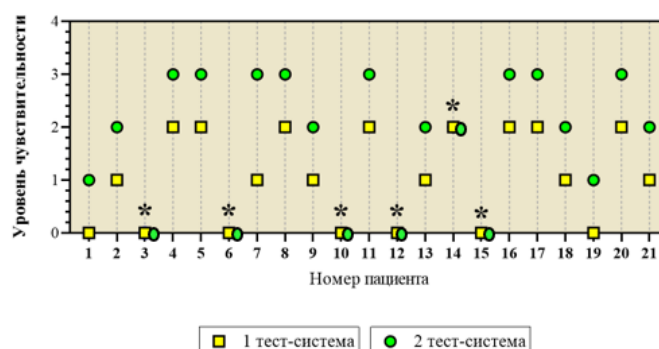


Рис. 1. Содержание аллерген-специфического IgE на аллергены домашней пыли по результатам использования двух диагностических тест систем.

Примечание \* – случаи когда обе тест-системы показали один и тот же уровень чувствительности.

Также в сравнительном аспекте отмечается (рис.2), что на аллерген-специфический IgE куриного нативного яйца из 21 проведенного исследования чувствительность совпала в 10 случаях, в 2-х результатах расхождение на 2 единицы, в 9 расхождение результатов на единицу. По уровню чувствительности «ДТС №2» выше в сравнении с «ДТС №1».

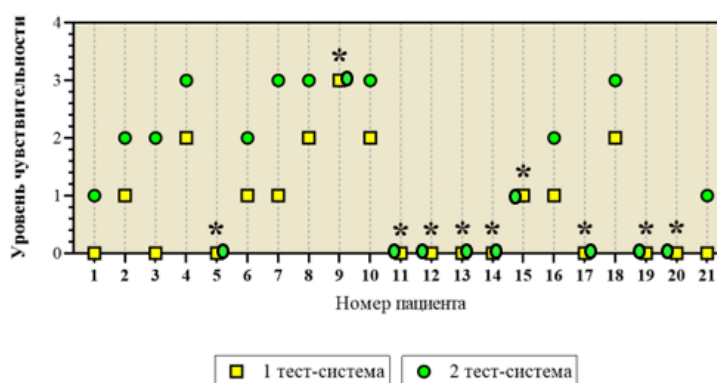


Рис. 2. Содержание аллерген-специфического IgE на аллергены нативного куриного яйца по результатам использования двух диагностических тест систем.

Примечание \* – случаи когда обе тест-системы показали один и тот же уровень чувствительности.

Сравнительный анализ уровня чувствительности (рис. 3) на аллерген-специфический IgE сорных трав отмечено, что из 21 проведенного исследования чувствительность совпала в 7 случаях, в одном случае расхождение на 2 единицы, в 13-ти случаях расхождение результатов на единицу. По уровню чувствительности «ДТС №2» выше в сравнении с «ДТС №1».

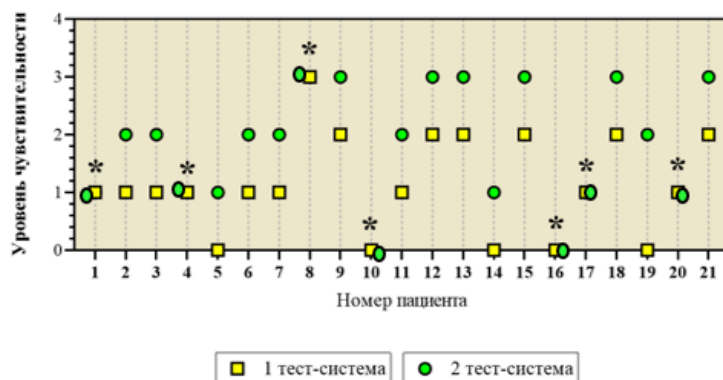


Рис. 3. Содержание аллерген-специфического IgE на аллергены сорных трав по результатам использования двух диагностических тест систем.

Примечание \* – случаи когда обе тест-системы показали один и тот же уровень чувствительности.

Выявленная нами, в сравнительном аспекте, концентрации свободных аллерген-специфических IgE имеет большое значение при диагностике и исследовании аллергических заболеваний и для последующего выбора адекватной терапии. Так, в частности, на основании полученных данных с помощью «ДТС №1» и «ДТС №2» выявлено, что содержание аллерген-специфического IgE на аллергены домашней пыли, нативного куриного яйца и сорных трав у детей в возрасте от 3 до 16 месяцев значимых статистических различий по полу не выявлено как в случае использования «ДТС №1», так и «ДТС №2».

Необходимо отметить, что отрицательных уровней чувствительности на аллерген-специфический IgE анализируемых аллергенов выявленных «ДТС №1» больше, чем при использовании «ДТС №2» – 22 и 11 соответственно. И наоборот, с помощью «ДТС №2» выявлено больше высоких уровней чувствительности на аллерген-специфический IgE анализируемых аллергенов чем с помощью «ДТС №1» – 2 и 21 соответственно. Полученные результаты в сравнительном аспекте можно объяснить:

– разностью уровня чувствительности. Так, у «ДТС №1» он составляет 50 КЕ/л, тогда как у «ДТС №2» 0,15МЕ/л;



– разностью в длине волны определения концентрации аллерген-специфический IgE. Так у «ДТС №1» длина волны фотометра лежит в пределах 450 нм, тогда как у «ДТС №2» предел длин волн измерения лежит в более широком диапазоне – от 405–450–620 нм;

– в «ДТС №1» использованы моноклональные анти-IgE-антитела, входящие в пероксидазный конъюгат, способный выявлять в сыворотке крови человека антитела класса IgE, которые аффинно взаимодействуют с аллергенами, сорбированными на поверхности полистиролового планшета;

– «ДТС №2» специфична к конкретным аллергенам. В лунках с исследуемыми образцами во время первой инкубации происходит иммобилизация разных молекул IgE, содержащихся в сыворотке крови, на твердой фазе. Если среди них имеются IgE, специфичные к выбранным аллергенам, то одновременно происходит их связывание с биотинилированным аллергеном.

В заключение хочется отметить, что примерно у 30% людей с atopическими заболеваниями уровень общего IgE находится в пределах нормы. Некоторые пациенты с бронхиальной астмой могут иметь повышенную чувствительность только к одному аллергену. В таких случаях общий IgE может быть в пределах нормы, но кожная проба и специфический IgE будут положительными. Обнаружение антител класса IgE, специфичных к определённому аллергену, не означает, что именно этот аллерген вызывает симптомы аллергии. Отсутствие специфического IgE в сыворотке крови не исключает возможности участия IgE-зависимого механизма, так как IgE может синтезироваться местно и вызывать сенсibilизацию тучных клеток даже при отсутствии в кровотоке. Антитела других классов, особенно IgG4, могут давать ложноотрицательные результаты, специфичные для данного аллергена. У некоторых пациентов с АД могут наблюдаться высокие концентрации общего IgE, что может привести к ложноположительным результатам из-за неспецифического связывания с аллергеном [4].

Повышение уровней общего и специфических IgE в сыворотке крови является важным диагностическим критерием atopической гиперчувствительности и

позволяет установить патогенетический вариант АД. Выделяют IgE-опосредованный (extrinsic) тип АД и внутренний (intrinsic) тип АД, который не связан с продукцией IgE и обозначается как не-IgE-опосредованный АД. В большинстве случаев ПА у детей раннего возраста является IgE-опосредуемой. Это иммунологические реакции на пищу, которые возникают без выявления специфических IgE-антител в коже или сыворотке и, следовательно, могут иметь несколько патогенных механизмов. В первые месяцы после рождения у младенцев могут определяться аллергенспецифические IgE, не имеющие диагностического значения [6]. Современные тестовые системы позволяют выявить триггерный фактор, который отвечает за гиперпродукцию IgE. Выявление и количественное определение концентрации свободных аллерген-специфичных IgE имеет большое значение при диагностике и исследовании аллергических заболеваний, для выбора адекватной терапии.

### ***Список литературы***

1. Ильенкова Н.А. Клиническое наблюдение пациента с реализацией атопического марша / Н.А. Ильенкова, О.С. Коноплева, Л.В. Степанова // Лечащий врач. – 2019.
2. Мирзоян В.Л. Атопический дерматит. Алгоритмы диагностики и лечения: учебное пособие / В.Л. Мирзоян, К.И. Разнатовский, К.Н. Монахов. – СПб.: СЗГМУ им. И.И. Мечникова, 2018. – 64 с.
3. Особенности диагностики аллергии у детей / Л.С. Намазова-Баранова, М.А. Сновская, И.Л. Митюшин [и др.] // Вестник РАМН. – 2017. – №72 (1). – С. 33–41.
4. Рыбникова Е.А. Современные подходы к лабораторной диагностике аллергии – в помощь практикующему врачу / Е.А. Рыбникова, А.П. Продеус, Т.Г. Федоскова // РМЖ. Медицинское обозрение. – 2021. – №1. – С. 43–49. – DOI 10.32364/2587-6821-2021-5-1-43-49. – EDN TLBTZZ
5. Garkaby J., Epov L., Musallam N. [et al.]. The sesame-peanut conundrum in Israel: reevaluation of food allergy prevalence in young children // J Allergy Clin Immunol Pract. 2021. №9. Pp. 200–205.

6. Kamemura N., Tada H., Shimojo N. [et al.]. Intrauterine sensitization of allergen-specific IgE analyzed by a highly sensitive new allergen microarray // *Allergy Clin Immunol.* 2012. 130 (1). 113–121 e112.
7. Saini S., Pansare M. New ideas and treatments for atopic dermatitis. // *North American Pediatric Clinical Cases.* 2019. 66(5). Pp. 1021–1033.
8. Turatbekova K.T., Furtikova A.B., Asheraliyev M.E. National center for maternal and child health // *Mother and child health.* 2022. №3–4. Pp. 4–11.