



№1 (41) март 2012

Главный редактор:

Эмануэль В. А., д. м. н., проф.

Заместители главного редактора:

Зыбина Н. Н., д. б. н., проф.

Сухоруков В. С., д. м. н., проф.

Директор редакции:

Чердниченко Д. В., к. м. н.

Зав. редакцией:

Эмануэль Ю. В., к. м. н.

Редактор перевода:

Филиппова Н. А., к. м. н.

Ответственный секретарь

Джавлах Е. С.

Адрес редакции:

**197022, Санкт-Петербург,
ул. Льва Толстого, д. 6/8**

Телефон редакции:

(812) 233 97 26

Эл. почта:

eivcons@mail.ru

Журнал зарегистрирован

в Федеральной службе

по надзору в сфере связи,

информационных технологий

и массовых коммуникаций

(Роскомнадзор)

Свидетельство о регистрации:

ПИ №ФС77-38698 от 22.01.2010

Учредитель:

ГОУ ВПО «СПб Государственный

медицинский университет

им. акад. И. П. Павлова

Федерального агентства

по здравоохранению

и социальному развитию»

(197022, Санкт-Петербург,

ул. Льва Толстого, д. 6/8)

Журнал издается при поддержке

ООО «АкваТест СПб»

Санкт-Петербург

Подготовка к печати и печать:

ООО «Издательско-

полиграфическая

компания «КОСТА»,

тел. **(812) 445 10 02**

Санкт-Петербург,

Новочеркасский пр., д. 58

Тираж 2000 экз.

Заказ №

КЛИНИКО - ЛАБОРАТОРНЫЙ КОНСИЛИУМ

НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Пусть первый подснежник

Подарит Вам нежность!

Весеннее солнце

Подарит тепло!

А мартовский ветер

Подарит надежду,

И счастье, и радость,

И только добро!

Редакция



**РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ ЖУРНАЛА
«КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЙ КОНСИЛИУМ»**

- | | |
|---|---|
| Антонова И.Н., д. м. н., профессор, СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова | Карпишенко А.И., д. м. н., профессор, СПб ГУЗ МИАЦ |
| Афанасьев Б.В., д. м. н., профессор, СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова | Ларионова В.И., д. м. н., профессор, СПбГМА им. И. И. Мечникова |
| Вавилова Т.В., д. м. н., СПбГМА им. И.И. Мечникова | Лиознов Д.А., д. м. н., доцент, СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова |
| Власов Т.Д., д. м. н., профессор, СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова | Матвеев С.В., д. м. н., профессор, СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова |
| Жлоба А.А., д. м. н., профессор, СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова | Смирнов А.В., д. м. н., профессор, СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова |
| Звартау Э.Э., д. м. н., профессор, СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова | Сухоруков В.С., д. м. н., профессор, НИЛ общей патологии НИИ педиатрии и детской хирургии РАМН (Москва) |
| Зыбина Н.Н., д. б. н., профессор, ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова МЧС (Санкт-Петербург) | Хоровская Л.А., д. м. н., СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова |
| Зуева Е.Е., д. м. н., СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова | Чухловин А.Б., д. м. н., СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова |
| | Эмануэль В.А., д. м. н., профессор, СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова |
| | Ягмуров О.Д., д. м. н., профессор, СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова |

**РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ ЖУРНАЛА
«КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЙ КОНСИЛИУМ»**

- | | |
|--|---|
| Айламазян Э.А., д. м. н., профессор, академик РАМН, з. д. н. РФ, НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта РАМН (Санкт-Петербург) | Сапрыгин Д.Б., д. м. н., профессор, РМАПО (Москва) |
| Дидур М.Д., д. м. н., профессор, ФГУ «Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» (Санкт-Петербург) | Соколовский Е.В., д. м. н., профессор, СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова |
| Дубина М.В., д. м. н., профессор, член-корреспондент РАН, СПбФТНОЦ РАН | Стивен Хау Ян Вонг, Ph. D., DABCC (TC), FACS, председатель секции протеомики и молекулярной патологии AACCC (США) |
| Дюк В.А., д. т. н., профессор, СПИИРАН (Санкт-Петербург) | Бринкманн Т., адъюнкт-профессор клинической биохимии медицинского факультета Университета Рура в Бохуме (Германия) |
| Каллер Андерс, д. м. н., профессор, Каролинский госпиталь (Стокгольм, Швеция) | Цыган В.Н., д. м. н., профессор, член-корреспондент РАЕН, ВМА им. С.М. Кирова (Санкт-Петербург) |
| Мазуров В.И., д. м. н., профессор, академик РАМН, з. д. н. РФ, СПбМАПО | Шляхто Е.В., д. м. н., профессор, академик РАМН, з. д. н. РФ, ФГУ «Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» (Санкт-Петербург) |
| Петришев Н.Н., д. м. н., профессор, академик МАНВШ, академик РАЕН, з. д. н. РФ, СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова | |

Содержание

| | |
|--|----|
| ВСТУПИТЕЛЬНОЕ СЛОВО | 1 |
| РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ, РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ | 2 |
| МАТЕРИАЛЫ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ «ПРОБЛЕМЫ АЛЛЕРГОЛОГИИ У СТОМАТОЛОГИЧЕСКОГО ПАЦИЕНТА» | |
| <i>М.Я. Левин, П.Г. Назаров</i> АУТОИММУНИТЕТ И ФАКТОРЫ ВОСПАЛЕНИЯ В ПАТОГЕНЕЗЕ СТОМАТОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ | 4 |
| <i>Т.В. Блинова, С.В. Лапин</i> ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА АЛЛЕРГИЧЕСКИХ И РЯДА ДРУГИХ ИММУНОПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ В СТОМАТОЛОГИИ | 11 |
| <i>А.Б. Чухловин</i> РОЛЬ ВИРУСНЫХ ПАТОГЕНОВ В РАЗВИТИИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ | 21 |
| <i>Л.Л. Лазаренко</i> ОПРЕДЕЛЕНИЕ IgE И IgG-АНТИТЕЛ ПРИ АЛЛЕРГИИ К МЕСТНЫМ АНЕСТЕТИКАМ И ПРОТЕЗНЫМ МАТЕРИАЛАМ. КАКОВО ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ? | 26 |
| <i>Ю.А. Прохорова, Н.Е. Соколова, Е.Е. Зуева</i> РАННЯЯ ДИАГНОСТИКА НАСЛЕДСТВЕННОГО СФЕРОЦИТОЗА КАК ПРОФИЛАКТИКА ДЕФОРМАЦИИ ЛИЦЕВОГО СКЕЛЕТА. | 40 |
| <i>Н.А. Колтовой</i> КРИСТАЛЛОГРАФИЧЕСКИЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ СЛЮНЫ | 46 |
| РАЗНОЕ | |
| <i>В.В. Вельков</i> ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНОЕ ИЗМЕРЕНИЕ КАРДИАЛЬНЫХ ТРОПОНИНОВ: ТЕСТ, КОТОРЫЙ СПАСАЕТ ЖИЗНИ. | 47 |
| <i>Т.А. Штам, Г.Р. Виноградская, А.В. Волницкий, Р.А. Ковалев, Е.В. Семенова, М.В. Филатов</i> ЭПИГЕНЕТИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ НЕКОТОРЫХ ОНКОГЕНОВ И ВОЗМОЖНОСТИ ЕЕ ПРАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ. | 53 |
| ИНФОРМАЦИЯ | |
| НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ «ОПТИМИЗАЦИЯ ДИАЛОГА ЛАБОРАТОРИИ И КЛИНИЦИСТА» | 59 |

АУТОИММУНИТЕТ И ФАКТОРЫ ВОСПАЛЕНИЯ В ПАТОГЕНЕЗЕ СТОМАТОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

М.Я. ЛЕВИН, П.Г. НАЗАРОВ

ГБОУ ВПО СПбГМУ им. И.П. Павлова Минздравсоцразвития России, Санкт-Петербург

Резюме. Приведены результаты клинико-иммунологических исследований больных с воспалительными заболеваниями пародонта (ВЗП). У 211 больных с ВЗП (14 – с гингивитом, 75 – с пародонтитом начальной стадии, 75 – с пародонтитами легкой степени, 81 – с пародонтитами средней степени, 41 – с пародонтитами тяжелой степени, а также 27 контрольных лиц) исследовали показатели аутоиммунного ответа: наличие и концентрацию в плазме крови и слюне аутоантигена десен, аутоантител к антигену десен, циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) и сенсибилизированных к антигену десен лимфоцитов в реакции торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ). Показано, что аутоантитела и развитие ГЗТ (гиперчувствительности замедленного типа) к десневому антигену в виде положительной реакции РТМЛ появляются задолго до появления клинических признаков заболевания. Результаты исследования свидетельствуют об участии аутоиммунных и иммунопатологических реакций в патогенезе пародонтита.

Ключевые слова: воспалительные заболевания пародонта, аутоиммунитет, антиген десен, аутоантитела, гиперчувствительность замедленного типа.

AUTOIMMUNE AND INFLAMMATORY FACTORS IN THE PATHOGENESIS OF DENTAL DISEASES

M.YA. LEVIN, P.G. NAZAROV

State budget educational institution of higher professional education "St. Petersburg Pavlov State Medical University", Ministry of Health Care and social development; St. Petersburg, Russia

Summary. The article presents the results of clinical and immunological studies of patients with inflammatory parodontal diseases (IPD). In 211 IPD patients (14 – with gingivitis, 75 – with the initial stage of parodontitis, 75 – with mild parodontitis, 81 – with moderate parodontitis, and 41 – with severe parodontitis, as well as 27 healthy persons), the following manifestations of autoimmunity were registered: the presence of and concentration in blood plasma and saliva of gum autoantigen, gum-specific autoantibodies, circulating immune complexes (CIC) and the delayed type hypersensitivity (DTH) to the gum antigen measured by the reaction of inhibition of leukocyte migration (RIML). Autoantibodies and DTH to the gingival antigen appeared long before the onset of clinical signs of disease. The findings suggest the participation of autoimmune and immunopathologic reactions in the pathogenesis of parodontitis.

Key words: inflammatory parodontal disease, autoimmunity, gum antigen, autoantibodies, delayed-type hypersensitivity.

Данные для корреспонденции:

Левин Мирон Яковлевич, з. д. н. РФ, доктор медицинских наук, профессор, академик РАЕН, заведующий лабораторией клинической иммунологии Научно-практического центра «Стоматология» Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия; тел. (812)727-00-82, e-mail: peter_nazarov@mail.ru

Успехи клинической иммунологии, выявляющей молекулярные и клеточные механизмы формирования различных патологических состояний организма, способствовали интенсификации патогенетических исследований в стоматологии. Это позволило в последние годы уделить большое внимание иммунопатологическим механизмам формирования воспалительных заболеваний пародонта (ВЗП) [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7].

Однако, несмотря на многочисленные исследования, посвященные заболеваниям пародонта воспалительно-генеза, многие аспекты иммунологических наруше-

ний, в том числе аутоиммунных, в патогенезе этих заболеваний остаются недостаточно выясненными и дискуссионными. Вместе с тем, изучение указанных вопросов чрезвычайно важно, поскольку основой клинической симптоматики этих заболеваний является хроническое воспаление пародонта. Следовательно, существенная, если не ключевая, роль в осуществлении этого процесса, наряду с другими факторами, принадлежит аутоиммунным реакциям гуморального и клеточного типа.

Целью настоящего исследования было изучение у пациентов с заболеваниями пародонта состояния ау-

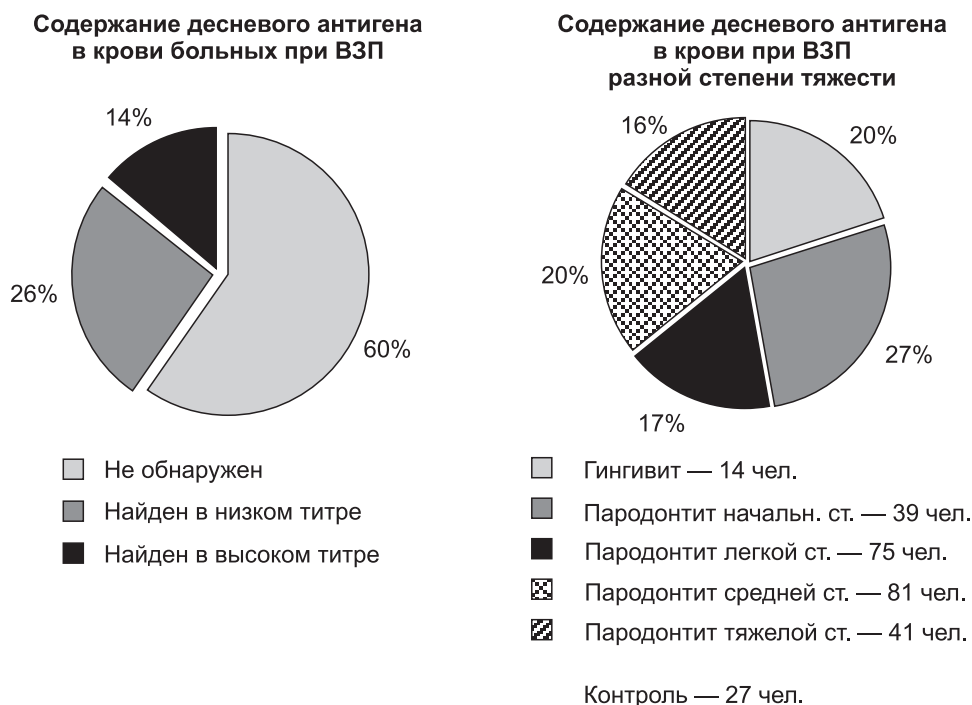


Рис. 1. Содержание аутоантигена десны в сыворотке крови больных с воспалительными заболеваниями пародонта

тоиммунных гуморальных и клеточных процессов для суждения об их особенностях и роли в патогенезе этих заболеваний в зависимости от стадии течения и клинической формы проявления.

Материалы и методы

Для характеристики аутоиммунных процессов гуморального типа использовали определение наличия и уровня в крови антигена ткани десны, аутоантител к нему и иммунных комплексов антиген-антитело.

Выявление десневого аутоантигена в крови производили с помощью РТПГА (реакции торможения пассивной гемагглютинации). При решении вопроса о выборе метода обнаружения десневого антигена целесообразно было исходить из хорошо апробированной в серологических исследованиях практики — достаточно чувствительной серологической реакции, обладающей и органной специфичностью. Этим требованиям отвечала реакция торможения пассивной гемагглютинации (РТПГА), при постановке которой использовалась кроличья противодесневая иммунная сыворотка.

Выявление аутоантител к десневому антигену производили с помощью РПГА (реакции пассивной гемагглютинации) с применением кроличьей антисыворотки к антигену десны человека. При этом использовали эритроциты барана, конъюгированные с десневым антигеном. Сыворотки больных, содержащие аутоантитела к десневому антигену, вызывали агглютинацию таких тест-эритроцитов [8, 9, 10].

Иммунопатологические повреждения тканей чаще всего связаны с механизмами клеточного иммунитета.

Для оценки такого рода процессов использовали широко распространенный тест торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ) пациентов в присутствии десневого антигена. Тест основан на том, что сенсibilизированные лимфоциты при действии антигена (либо митогена) продуцируют лимфокины, препятствующие миграционной активности лейкоцитов.

Результаты и обсуждение

Пациенты с заболеваниями пародонта были разделены на пять групп. Первую группу (14 человек) составили больные с гингивитами, вторую (39 человек) — с пародонтитами начальной стадии, третью (75 человек) — с пародонтитами легкой степени, четвертую (81 человек) — с пародонтитами средней степени, пятую (41 человек) — с пародонтитами тяжелой степени. В контрольную группу (27 человек) вошли практически здоровые лица со здоровым пародонтом.

Для выяснения участия аутоиммунных процессов в патогенезе воспалительных заболеваний пародонта прежде всего требовалось оценить уровень поступления в кровотоки антигенов пораженной десны.

Обнаружение антигена десны в крови является показателем повреждения десневой ткани и поступления десневого антигена в циркуляцию. Присутствие в крови аутоантигена еще не свидетельствует об аутоиммунном процессе, но является предпосылкой для его развития.

Как видно на левой диаграмме рисунка 1, в общей группе больных ВЗП частота выявления десневого антигена составляет 40%. Правая диаграмма рисунка 1 по-

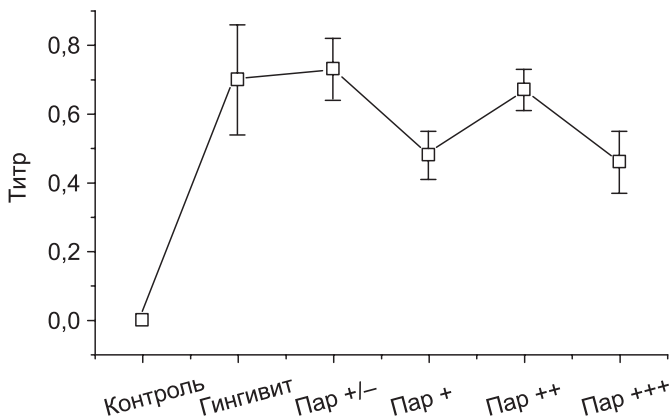


Рис. 2. Титры десневого антигена в крови больных при нарастании тяжести ВЗП.
Условные обозначения, здесь и далее:
«Пар» — пародонтит, знаки «+», «++», «+++» — степень тяжести заболевания

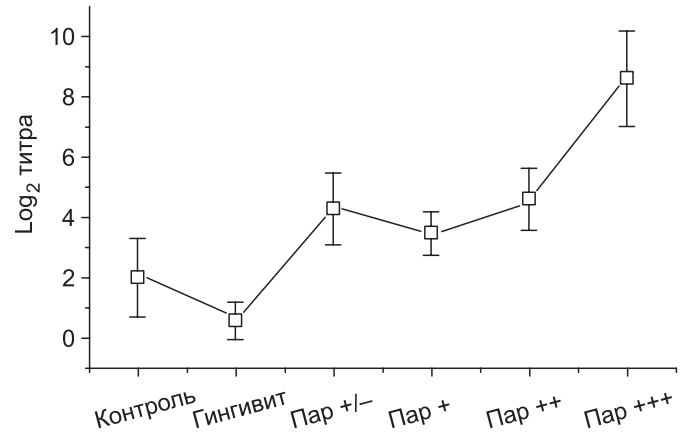


Рис. 3. Титры аутоантител к десневому антигену в крови больных при нарастании тяжести ВЗП

казывает, что содержание десневого антигена практически не зависит от формы заболевания (гингивит или пародонтит) и от степени тяжести гингивита. При всех формах ВЗП уровень десневого антигена одинаков. У здоровых людей десневой антиген в исследованиях выявлен не был.

Более детально это продемонстрировано на рисунке 2. Оказалось, что уровень десневого антигена не зависит от степени тяжести пародонтита. Закономерное обнаружение антигена десны во всех группах является показателем повреждения десневой ткани и поступления антигена в циркуляцию.

Известно, что при гингивитах и пародонтитах имеет место выраженное повреждение тканей десны, вызванное инфекционными и воспалительными процессами, а также травмами и лечебными процедурами. В этих случаях вероятно не только поступление антигена разрушенной ткани в циркуляцию, но и его денатурация,

образование иммуногенных комплексов с продуктами микрофлоры.

На рисунке 3 показаны титры аутоантител к антигену десны у больных с ВЗП. Титры аутоантител нарастают с повышением степени тяжести заболевания. В отличие от концентрации десневого антигена, которая мало колебалась при разных степенях активности пародонтита, титры аутоантител, напротив, имеют тенденцию к росту по мере повышения степени тяжести заболевания. Однако обнаружение аутоантител также еще не означает обязательной индукции иммунопатологического процесса, так как антитела могут способствовать элиминации антигена из крови без повреждения здоровой ткани.

На рисунке 4 представлены данные по частоте выявления аутоантител к антигену десны в крови больных с ВЗП. Высокий уровень аутоантител способствует элиминации из крови антигена, и, как видно на рисунке 4,

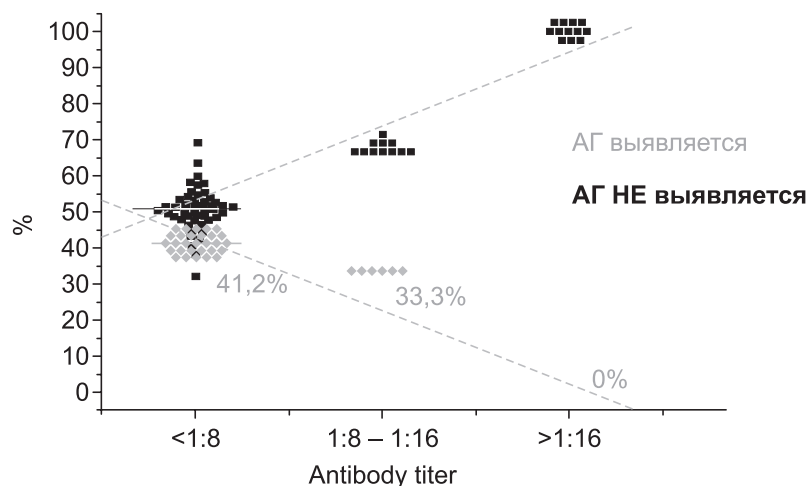


Рис. 4. Свободный антиген десны лучше выявляется в отсутствие аутоантител (процент больных).
Условные обозначения: квадратики — случаи, когда антиген не выявлялся, ромбики — случаи, когда антиген был выявлен

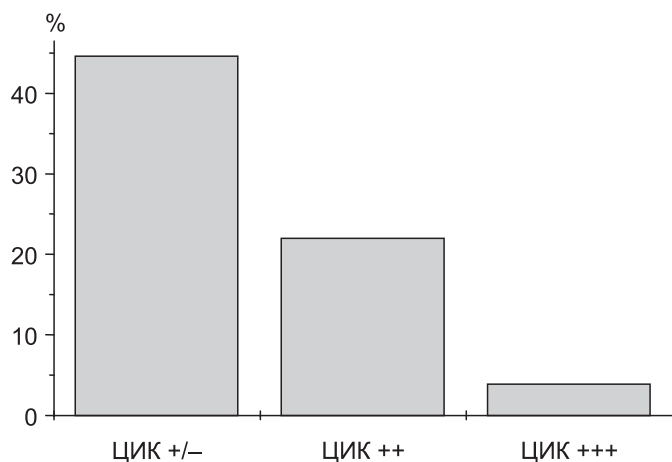


Рис. 5. Свободный десневой антиген в крови больных ВЗП при разном содержании циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК)

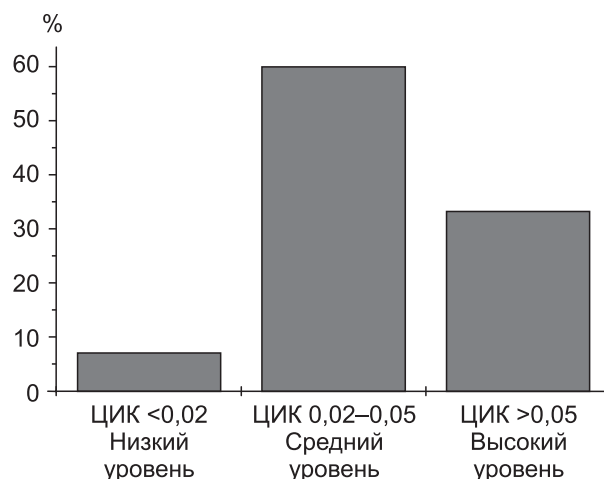


Рис. 6. Частота обнаружения ЦИК при ВЗП (% больных)

в этих случаях антиген действительно не обнаруживался. Наоборот, при отсутствии антител (или при низком их уровне) антиген обнаруживался в 41,2% случаев. Сопоставление найденных в крови больных антигена и антител показало, что при высоких титрах антител антиген в крови не был обнаружен ни разу. При отсутствии или низких титрах антител антиген выявлен у 41,2% больных, а при средних их количествах — в 33,3% случаев. Эти данные подтверждают, что антитела при воспалительных заболеваниях пародонта способствуют элиминации антигена.

Диаграмма на рисунке 4 иллюстрирует эту закономерность. При низких титрах аутоантител десневой антиген выявлялся довольно часто (примерно в половине случаев, квадратики). При среднем уровне титров аутоантител (1:8 — 1:16) антиген десны начинал выявляться реже (в 30% случаев, ромбики). И, наконец, при высоких титрах аутоантител (выше 1:16) антиген десны переставал выявляться совсем (отсутствие ромбиков).

Похожая обратная зависимость выявляемости десневого антигена отмечается и по отношению к наличию циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК). Как видно на рисунке 5, десневой антиген лучше всего выявлялся у тех больных, у которых уровень иммунных комплексов невысок. Комплексы антиген-антитело неизбежно формируются при наличии в циркуляции антигенов и антител. Комплексы антиген-антитело относятся к структурам, обуславливающим нейтрализацию и элиминацию антигена. Но при определенных условиях ЦИК могут оказывать патогенное (иммунопатологическое) действие. Это характерно для иммунных комплексов определенного состава, например, для комплексов, плохо поглощаемых фагоцитами, для мелких иммунных комплексов, а также для комплексов, сформированных в зоне избытка антигена.

Имеется тенденция к повышению частоты выявления иммунных комплексов от гингивитов к пародонти-

там средней и тяжелой степени. Так, частота выявления ЦИК была следующей: в группе больных гингивитами — 22%, у больных пародонтитами легкой степени — 32,2%, у больных пародонтитами тяжелой степени — 54,6% ($p < 0,05$).

При высоком содержании ЦИК в крови антиген десны выявляется в 10 раз реже, чем в случаях, когда ЦИК не обнаруживаются или обнаруживаются в минимальных количествах. Вообще, нужно сказать, что частота обнаружения ЦИК у больных ВЗП довольно высока. Как видно на рисунке 6, практически у 90% пациентов обнаруживается умеренное или высокое содержание ЦИК в крови.

Чтобы понять клиническое значение аутоантител и иммунных комплексов, следует вспомнить, что физиологическая роль ЦИК состоит в элиминации антигенов. В связи с этим сопоставление уровня обнаруживаемых ЦИК с наличием или отсутствием в циркуляции антигена десны показывает, что при наличии в крови высокого содержания ЦИК антиген обнаруживается в 10 раз реже, чем в случаях, когда ЦИК не обнаруживались или обнаруживались в минимальных количествах.

Ниже рассмотрены данные, полученные при исследовании у больных ВЗП клеточной сенсibilизации к антигену десны. Клеточную сенсibilизацию оценивали по реакции торможения лейкоцитов больных в капиллярах Перфильева-Габе при инкубации с антигеном десны. Результаты этого исследования показали, что когда в крови больных обнаруживался антиген десны, клеточная сенсibilизация наблюдалась у 71,5% больных; если антигена десны в крови не было, клеточная сенсibilизация наблюдалась достоверно реже, у 54% больных ($p < 0,05$).

Имунопатологические повреждения тканей чаще всего связаны с механизмами клеточного иммунитета. Для оценки такого рода процессов мы использовали известный лабораторный тест торможения миграции лей-

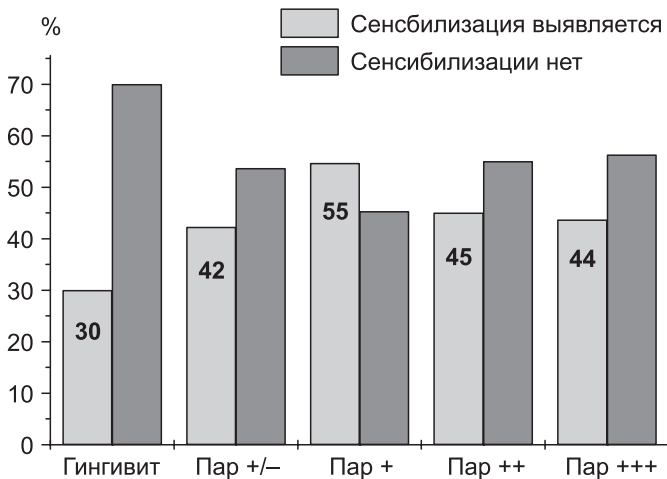


Рис. 7. Частота клеточной сенсибилизации к антигену десны при ВЗП

коцитов пациентов в присутствии десневого антигена *in vitro*. Тест основан на том, что сенсибилизированные Т-лимфоциты в присутствии специфического антигена продуцируют цитокины (в частности, фактор, ингибирующий миграцию лейкоцитов), препятствующие миграционной активности лейкоцитов.

Таким образом, лабораторная детекция клеточного иммунного ответа в виде реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) позволяла сопоставить три важных для аутоиммунитета фактора: 1) появление в крови антигена, 2) образование к нему аутоантител и 3) формирование сенсибилизированных Т-лимфоцитов и, тем самым, сравнить формирование гуморального и клеточного иммунного ответа.

По существу, определяя ЦИК, свободные антитела к десневому антигену и сенсибилизированные лимфоциты, а также концентрацию десневого антигена, мы устанавливали наличие аутоиммунных реакций как гуморального, так и клеточного типа и степень их интенсивности, что позволяет определить роль данных реакций в патогенезе этих заболеваний.

Как видно на рисунке 7, формирование Т-клеточного иммунного ответа начинается уже у больных гингивитом (частота положительных реакций составляла 30%). При развитии пародонтита частота выявления ГЗТ к десневому антигену возрастает и при всех стадиях пародонтита остается повышенной по сравнению с гингивитом.

У больных, в крови которых был обнаружен антиген десны, сенсибилизация к нему наблюдалась чаще, чем у больных без антигена (71,4% против 53,9%).

Таким образом, приведенные данные иллюстрируют классическое пред-

ставление, что попадание антигенов десны в циркуляцию может быть фактором, обуславливающим развитие сенсибилизации к этому антигену.

При пародонтитах отсутствие антител и клеточной сенсибилизации наблюдалось реже, независимо от формы заболевания. Вместе с этим, в начальной стадии, а также при легкой и средней степени пародонтита ясно преобладали случаи клеточной сенсибилизации при отсутствии антител. С развитием третьей, наиболее тяжелой степени пародонтита, резко повысилось число случаев (до 37,5%), при которых у больных присутствие антител сочеталось с выраженной клеточной сенсибилизацией. Можно полагать, что сочетание антитканевых антител с клеточной сенсибилизацией является неблагоприятным в патогенезе и клиническом течении пародонтитов. Выявление снижения частоты тканевого антигена в случаях высокого уровня антител ставит вопрос о формировании комплексов антиген-антитело при разных клинических ситуациях.

Средние сывороточные показатели трех иммуноглобулинов (IgM, IgG, IgA) достоверно снижены во всех группах больных (рис. 8). При этом обращает на себя внимание резкое снижение уровня IgG и общего IgA уже на ранней стадии пародонтита. В то же время при начальной, первой и второй стадиях пародонтита наблюдается заметный рост уровня секреторного sIgA в ротовой жидкости. Это, по-видимому, отражает попытку включения компенсаторного механизма замещения секреторным иммуноглобулином защитной функции иммуноглобулинов других классов. Однако на более продвинутых стадиях развития пародонтита (второй и третьей) видно, что этот механизм не справляется с задачей, и уровень секреторного sIgA снова падает ниже уровня контрольной группы.

На рисунке 9 приведены уровни лизоцима в ротовой жидкости больных ВЗП. Уровень лизоцима коле-

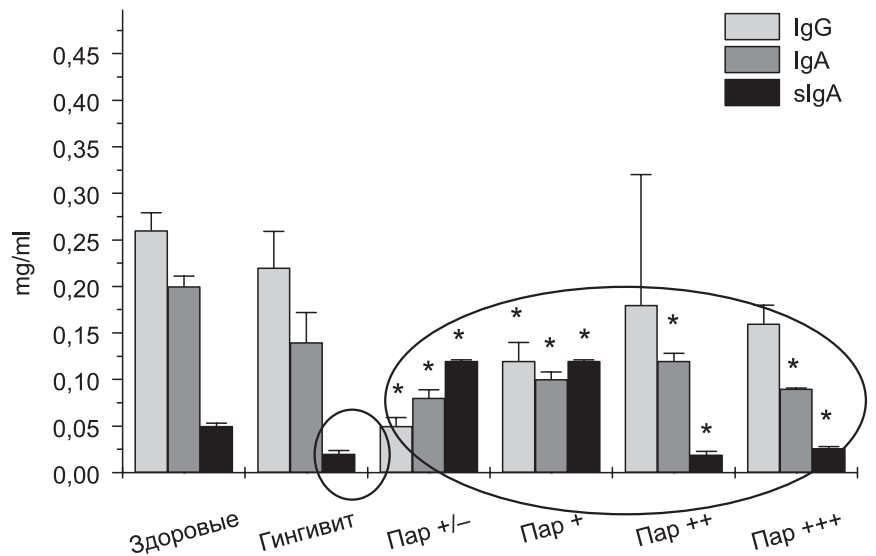


Рис. 8. Уровень иммуноглобулинов в ротовой жидкости больных ВЗП

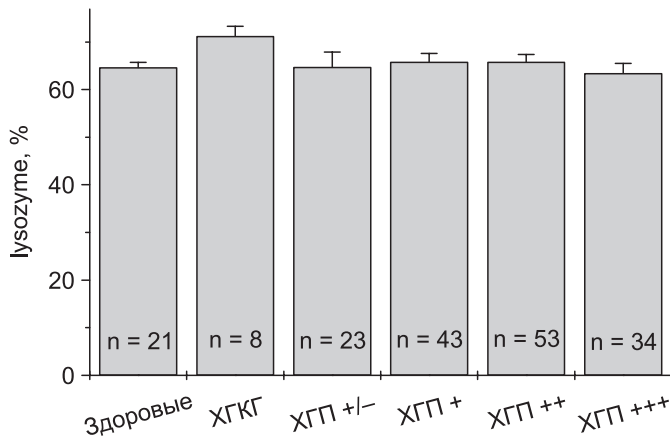


Рис. 9. Уровень лизоцима в ротовой жидкости больных ВЗП

бался незначительно и не зависел от формы заболевания. Уровни лизоцима в крови и ротовой жидкости не коррелировали между собой. Рассмотрение частоты выявления лизоцима и иммуноглобулинов в ротовой жидкости у здоровых лиц указывает на вероятность компенсации дефицита лизоцима иммуноглобулинами (и наоборот). Можно думать, что достаточная активность лизоцима в ротовой полости больных ВЗП обеспечивает ее защищенность. При этом нет стимулов к увеличению уровня иммуноглобулинов, относящихся ко «второму» эшелону защиты. В случае недостаточности лизоцимовой защиты усиливается поступление иммуноглобулинов в ротовую жидкость. Поскольку все формы пародонтитов (кроме тяжелой степени) харак-

теризовались выраженностью иммунологических сдвигов, можно полагать, что клинические отличия между формами связаны с различной чувствительностью больных к иммунопатологическим воздействиям.

Таким образом, правомочно заключить, что заболевания пародонта сопровождаются развитием аутоиммунных процессов, которые могут оказаться ведущим фактором хронизации воспалительных заболеваний пародонта и быть существенным компонентом его патогенеза.

Приведенная на рисунке 10 схема изображает события, происходящие в слизистой оболочке в ходе воспалительной и иммунной реакции. Многослойный эпителий, покрывающий ткань пародонта, лежит на базальной мембране и открыт в полость рта. В пределах собственной пластинки (*lamina propria*) располагаются разные типы клеток иммунной системы. Активными участниками иммунного ответа на антиген являются дендритные клетки (на рисунке — АПК, антигенпредставляющие клетки). Они захватывают и обрабатывают антигены (в том числе и аутоантигены, например, антигены десны) и контактируют с наивными Т-клетками, стимулируя превращение последних в Т-хелперы 1-го типа (Th1), способствующие развитию процессов клеточной сенсibilизации, либо в Т-хелперы 2-го типа (Th2), помогающие развитию гуморального иммунного ответа и синтезу иммуноглобулинов (и аутоантител) В-клетками. Превращение Т-клеток в Т-хелперы 1-го типа нуждается в поддержке таких цитокинов, как интерферон-гамма (IFN γ) и фактор некроза опухолей-

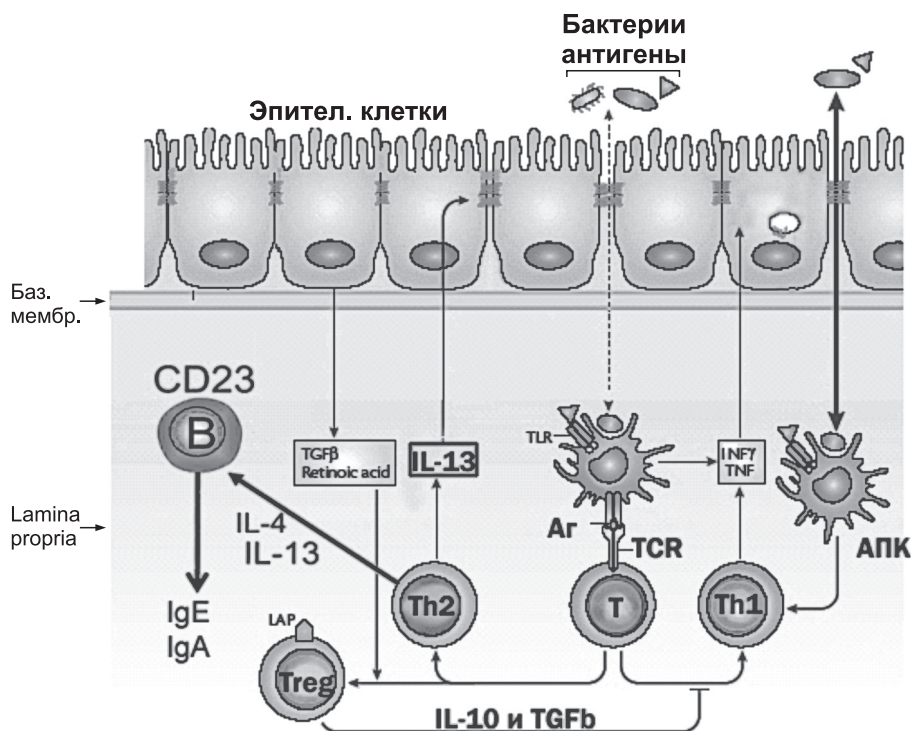


Рис. 10. Схема построения иммунной защиты слизистых [11]

альфа (TNF α). Превращение Т-клеток в Т-хелперы 2-го типа требует поддержки со стороны цитокинов IL-4, IL-13 и некоторых других. При взаимодействии дендритной клетки с наивными Т-лимфоцитами возможно также образование так называемых регуляторных Т-клеток (Treg), обладающих супрессорными свойствами и способных подавлять развитие клеточной сенсибилизации с помощью ингибиторных цитокинов (IL-10 и TGF α — трансформирующего ростового фактора).

Таким образом, приведенные данные свидетельствуют о том, что аутоантитела к антигенам пародонта — ранний маркер, предшествующий появлению клинических

признаков ВЗП. Последовательность событий патогенеза ВЗП может быть представлена в следующем порядке: 1) процесс начинается с деструкции ткани пародонта, вызванной инфекцией или травмой; 2) появление в крови аутоантигенов инициирует аутоиммунный ответ на пародонт в виде продукции аутоантител и появления сенсибилизированных Т-клеток (клеточный и гуморальный аутоиммунный ответы); 3) аутоантитела и аутоантигены формируют ЦИК; возможно патогенное действие ЦИК на воспаленную ткань пародонта; 4) развивается клиническая картина ВЗП.

Литература

1. *Бабаджян Г.С.* Состояние местных защитных факторов у больных пародонтитом в динамике лечения: автореф. дис.... канд. мед. наук. М., 1983.

2. *Журавлева П.П.* Клинико-рентгенологические и лабораторные данные при различных состояниях пародонта у людей молодого возраста: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Л., 1988.

3. *Шаповалов В.Д.* Роль иммунных и сосудистых реакций в патогенезе пародонтита: автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 1995.

4. *Левин М.Я., Орехова Л.Ю.* Значение аутоиммунных процессов в патогенезе воспалительных заболеваний пародонта // Пародонтология. 1996; 1: 19–26.

5. *Левин М.Я., Федосенко Т.Д., Васильев О.Н.* Количественный и функциональный состав системного и местного иммунитета у пациентов с хроническими периодонтитами и пародонтитами // Пародонтология. 2010; 4: 37–40.

6. *Орехова Л.Ю.* Иммунологические механизмы в патогенезе воспалительных заболеваний пародонта: дисс. ... докт. мед. наук. СПб., 1997.

7. *Hayashi C., Gudino C.V., Gibson F.C., Genco C.A.* Pathogen-induced inflammation at sites distant from oral infection: bacterial persistence and induction of cell-specific innate immune inflammatory pathways // Mol. Oral Microbiol. 2010; 25 (5): 305–316.

8. *Лефковитс И., Пернис Б.* (Ред). Методы исследования в иммунологии: Пер. с англ. М.: Мир, 1981: 485.

9. *Косицкая Л.С., Попова О.Я., Лаврова Т.Р., Родштейн О.А.* Клиническая оценка методов определения циркулирующих иммунных комплексов при ревматических заболеваниях // Тер. архив. 1983; 55 (7): 19–24.

10. *Дерюгин М.В., Косицкая Л.С., Кузнецова С.А.* и др. Клинико-иммунологическая характеристика малосимптомного неревматического миокардита // Мед. иммунол. 2001; 3 (1): 99–103.

11. *Turner J.R.* Intestinal mucosal barrier function in health and disease // Nat. Rev. Immunol. 2009; 9: 799–809.

КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЙ
КОНСИЛИУМ

ПО ВОПРОСАМ СОТРУДНИЧЕСТВА ПРОСИМ ОБРАЩАТЬСЯ:

- ПУБЛИКАЦИЯ МАТЕРИАЛОВ
в научно-практическом журнале
«Клинико-лабораторный консилиум»

Эмануэль Владимир Леонидович

Тел. 8-905-229-60-22,
e-mail: ejvcons@mail.ru

- РЕКЛАМНЫЙ ОТДЕЛ:

Венкович Татьяна Анатольевна
Морозова Ирина Александровна

Тел./ф: (812) 600-22-74,
e-mail: akvatest@mail.ru

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА АЛЛЕРГИЧЕСКИХ И РЯДА ДРУГИХ ИММУНОПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ В СТОМАТОЛОГИИ

Т.В. БЛИНОВА*, С.В. ЛАПИН**

* НПЦ Стоматологии ГБОУ ВПО СПбГМУ им. И.П. Павлова

Минздравсоцразвития России, Санкт-Петербург

** НМЦ по молекулярной медицине ГБОУ ВПО СПбГМУ им. И.П. Павлова

Минздравсоцразвития России, Санкт-Петербург

Резюме. В последние десятилетия во всем мире наблюдается неуклонный рост числа аллергических заболеваний. На этом фоне растет количество обращений в стоматологические учреждения пациентов с аллергическим статусом. Они составляют группу риска развития аллергических реакций (АР) на различные препараты и материалы, используемые в стоматологии. В основном АР связаны с применением лекарственных препаратов (антибиотики, анестетики, антисептики, сульфаниламиды), протезных конструкций (сплавы металлов, пластмассы), пломбировочных и латекс-содержащих материалов. Реакции гиперчувствительности на препараты и материалы, используемые в стоматологии, как правило, развиваются по I или IV типу АР или без участия иммунных механизмов (псевдоаллергия). Для определения I типа АР, в котором участвуют IgE антитела, используются методы *in vitro* диагностики: иммуноферментный анализ (ИФА), ImmunoCAP, тест Шелли, проточная цитофлуориметрия. IV тип АР, опосредуемый сенсibilизированными T-лимфоцитами, диагностируется с помощью тестов: РБТЛ и РТМЛ. Рекомендуемые методы диагностики псевдоаллергических реакций: CAST®-ELISA и FLOW-CAST®. Кроме аллергических и псевдоаллергических осложнений, в своей практике врачи-стоматологи могут встретиться и с другими иммунопатологическими состояниями, в основе которых лежит аутоиммунный компонент: синдром Шегрена; болезнь Крона; дерматозы с поражением слизистой оболочки ротовой полости (пузырчатка, пемфигоид); системная красная волчанка. В статье представлены основные критерии и методы лабораторной диагностики данных заболеваний.

Ключевые слова: лабораторная диагностика, аллергические реакции, аутоиммунные заболевания, стоматологические материалы, лекарственные препараты.

LABORATORY DIAGNOSIS OF ALLERGIC CONDITIONS AND SOME OTHER IMMUNOPATHOLOGICAL DISEASES IN STOMATOLOGY

T.V. BLINOVA*, S.V. LAPIN**

State budget educational institution of higher professional education "St. Petersburg Pavlov State Medical University", Ministry of Health Care and social development; St. Petersburg, Russia

* Scientific Centre of Dental Medicine

** Scientific Center for Molecular Medicine

Summary. Last ten years the number of allergic diseases is gradually increasing overall the world. As well, number of allergic patients in dental medical institutions is also increasing. These patients have certain risk for allergic reaction development. Mainly allergic reactions are related to the drugs (antibiotics, anaesthetics, sulphanilamides), prosthetic constructions (metals, plastics), latex-containing materials etc. Hypersensitivity reactions to drugs and materials are usually related to I or IV type or pseudoallergy, which is developing without any immune mechanisms. For I type of allergic reactions, related to IgE antibodies *in vitro* immunoenzyme analysis can be used, ImmunoCAP, Shelly test, flow cytofluoremetry. IV type, mediated by sensibilized T-lymphocytes, can be diagnosed by blast transformation of lymphocytes reaction and leucocytes migration suppression reaction. For diagnose of pseudoallergic reactions following methods are recommended: CAST®-ELISA and FLOW-CAST®. Apart from allergic and pseudoallergic complications dental specialists can reveal other immune pathological conditions, mostly basing on autoimmune mechanism. These are Sjogren diseases, Crohn disease, dermatosis with oral mucosa affection, SLE. Article presents main criteria and methods of laboratory diagnosis of these diseases.

Key words: laboratory diagnosis, allergic reactions, autoimmune diseases, dental materials, drugs.

Данные для корреспонденции:

Блинова Татьяна Владимировна, к. б. н.,
 заведующая лабораторией клинико-диагностических исследований
 Научно-практического центра стоматологии ГБОУ ВПО СПбГМУ им. И.П. Павлова
 Минздравсоцразвития России,
 тел.: (812)234-90-39, 499-71-94, e-mail: tvblinova@list.ru

Лапин Сергей Владимирович, к. м. н.,
 заведующий лабораторией диагностики аутоиммунных заболеваний
 Научно-методического центра Минздрава России по молекулярной медицине
 на базе ГБОУ ВПО СПбГМУ им. И.П. Павлова Минздравсоцразвития России,
 тел.: (812) 234-90-39, 499-71-94, e-mail: autoimmun@mail.ru

Введение

Во всех странах мира в последние 30–40 лет отмечается значительный рост числа аллергических заболеваний (АЗ). Согласно данным ВОЗ, в настоящее время около 5% взрослого населения планеты и 15% детского страдают АЗ, частота которых в структуре неинфекционной патологии достигает 20–25% [1]. В различных регионах нашей страны уровень аллергических заболеваний среди населения достигает 15–35%, а в крупных промышленных городах, в экологически неблагоприятных регионах — 30–60% [2, 3, 4] (табл. 1).

Этому способствует ряд экзогенных факторов, участвующих в реализации генетической предрасположенности к АЗ, в том числе экологические, связанные с загрязнением окружающей среды; медикаментозные, вследствие доступности большого количества фармакологических средств; психологические, из-за увеличения стрессовых нагрузок; и эпидемиологические, отражаю-

щие рост количества инфекционных, сердечно-сосудистых, эндокринных и других заболеваний [2, 5, 6].

На фоне общего повышения аллергизации населения растет количество обращений в стоматологические учреждения пациентов с аллергическим статусом. Кроме того, нарастает частота аллергических заболеваний у медицинского персонала стоматологических учреждений. Вместе они составляют группу риска развития аллергических реакций (АР) на различные препараты и материалы, используемые в стоматологии [7, 8, 9, 10].

Аллергические реакции могут быть связаны с применением лекарственных препаратов (антибиотики, анестетики, антисептики, сульфаниламидные препараты), протезных конструкций (сплавы металлов, пластмасы), пломбирочных материалов (компоненты полимеров, сополимеры и др.), а также с использованием латексных перчаток, дренажей и других материалов, содержащих латекс (табл. 2).

Таблица 1. Распространенность аллергических заболеваний в Российской Федерации и за рубежом

| Заболевание | Количество больных (%) | |
|-------------------------------|------------------------|----------------------|
| | Все страны мира | Российская Федерация |
| Все аллергические заболевания | 20–25 | 15–35 |
| Бронхиальная астма | 1–18 | 2,6–20 |
| Аллергический ринит | 10–25 | 12,7–24 |
| Атопический дерматит: | | |
| Дети | 12–37 | 5,9 |
| Взрослые | 0,2–2 | |
| Крапивница | 15–25 | 15–30 |
| Лекарственная аллергия | 1–30 | > 5 |

Таблица 2. Частота аллергических реакций на лекарства и материалы, используемые в стоматологии

| Вид аллергена | Количество человек (%) |
|--------------------------|------------------------|
| Лекарственные препараты | 5,5–15,1 |
| Металлы и соли металлов | 13,6–69,8 |
| Акрилаты | 2–3 |
| Латекс: | |
| у медицинского персонала | 4,3–22 |
| у пациентов | 2,9 |

Аллергия на лекарственные препараты у стоматологических пациентов

Лекарственная аллергия (ЛА) в структуре всех АЗ среди амбулаторных больных составляет более 5% [11, 3, 7]. При этом, по данным разных авторов, чаще отмечаются реакции на антибиотики, местные анестетики и нестероидные противовоспалительные средства [2, 11, 12, 13].

В большей степени ЛА страдают женщины (65–76% случаев) и пациенты в возрасте от 20 до 50 лет [2].

Клинические симптомы, возникающие у стоматологических пациентов при аллергии на лекарственные препараты, могут быть самыми разнообразными.

Субъективные признаки лекарственной аллергии в ротовой полости:

- чувство жжения, покалывания, зуда;
- сухость во рту;
- болезненность при приеме пищи.

Объективные признаки лекарственной аллергии в ротовой полости:

- отечность языка, губ, десен, неба, слизистой оболочки;
- гиперемия слизистой оболочки с геморрагиями;
- атрофия сосочков языка;
- везикулезные высыпания;
- эрозивный / афтозный стоматит;
- атрофический или гипертрофический глоссит;
- отек Квинке, анафилактический шок.

Иногда можно проследить взаимосвязь лекарственных препаратов с клиническими симптомами, которые этими препаратами вызываются. Так, например, атрофия сосочков языка может произойти в результате приема антибиотиков пенициллинового ряда. Язвенные поражения в ротовой полости могут быть связаны с использованием нестероидных противовоспалительных средств (НПВС) [14]. Эрозивный стоматит развивается на фоне лечения сульфаниламидными препаратами. Атрофический и гипертрофический глоссит — типичная реакция на препараты тетрациклинового ряда. Отек Квинке, анафилактический шок могут вызываться местными анестетиками, антибиотиками, сульфаниламидами или НПВС [15]. Следует отметить, что у стоматологических пациентов системные реакции на местные анестетики встречаются достаточно редко [6, 8].

В большинстве случаев нет четкой специфической зависимости между клиническими проявлениями ЛА и видом лекарственного препарата. Иногда наблюдается одновременно несколько симптомов, обусловленных различными иммунологическими механизмами развития аллергической реакции, например, сочетание анафилактического шока и агранулоцитоза. Это связано с тем, что аллергическая реакция на лекарственные препараты может протекать по любому из 4 типов иммунологических механизмов развития аллергии, а иногда по нескольким одновременно, формируя комбинированную сенсибилизацию.

Контактная аллергия у стоматологических пациентов

Другая группа потенциально опасных аллергенов, с которыми сталкиваются пациенты стоматологических клиник, — это стоматологические конструкционные материалы, вернее, молекулы, ионы, продукты коррозии, которые образуются в процессе носки зубных протезов или после реставрации зубов пломбирочными материалами и проникают через эпителиальный барьер слизистой оболочки ротовой полости. К ним относятся различные компоненты пластмасс, смол, соли и сплавы металлов.

Частота нежелательных побочных реакций на материалы протезных конструкций, по разным источникам, составляет 1,7–12,3 % от всех пациентов, обратившихся в клинику ортопедической стоматологии [16, 17, 18, 19]. В большей степени страдают люди пожилого возраста [20]. Различия по полу не выявлены, за исключением сенсибилизации к никелю, которая более часто наблюдается у молодых женщин и связана, вероятно, с прокалыванием ушей [21, 22].

Среди металлов, используемых в стоматологии, лидирующее положение по способности вызывать реакции гиперчувствительности занимают никель, кобальт, палладий и хром [23, 24, 25, 26, 27, 28] (рис. 1). При этом палладий и кобальт обладают перекрестной реактивностью с никелем и редко встречаются в качестве моно-сенсибилизирующих агентов [29, 21, 26]. В последние годы появилось много сообщений о высокой частоте сенсибилизации к золоту у стоматологических пациентов [30, 31]. Однако эти реакции не всегда имеют клиническое значение [25, 26].

Сенсибилизация к акрилатам имеет место у 2–3% стоматологических пациентов и гораздо чаще встречается среди медицинского персонала стоматологических клиник [9, 32].

Клинические симптомы реакции гиперчувствительности могут развиваться не только на стоматологические конструкционные материалы, но также и на средства гигиены полости рта, латекс, канифоль [33, 34, 35, 36].

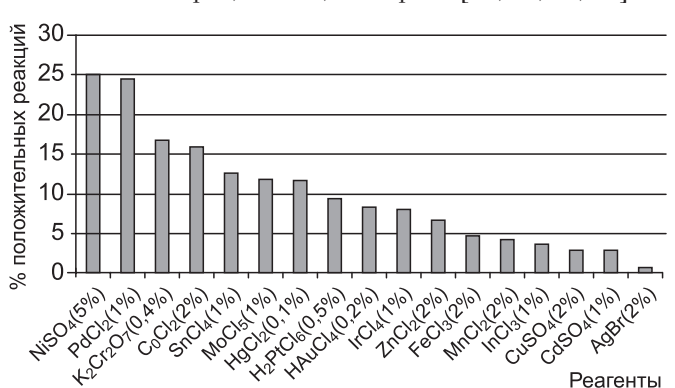


Рис. 1. Результаты патч-тестирования стоматологических пациентов с подозрением на аллергию к металлам.

Исследование проводилось в стоматологической клинике университета г. Токусима (Япония) в период с июля 2000 г. по июнь 2005 г. [24]

Субъективные признаки контактной аллергии в ротовой полости:

- привкус металла и/или кислоты;
- чувство жжения, покалывания языка и/или слизистой оболочки;
- сухость во рту.

Объективные признаки контактной аллергии в ротовой полости:

- эритема, гиперемия слизистой оболочки;
- отеки губ, языка, десен, слизистой оболочки;
- лихеноидные повреждения;
- эрозии и/или изъязвления;
- лейкоплакия-подобные повреждения слизистой оболочки;
- гранулематоз в области лица или ротовой полости.

Клинические проявления в виде эритемы и гиперемии слизистой оболочки ротовой полости (ОРП) могут вызываться ингредиентами зубных паст, жидкостью для полоскания рта, стоматологическими материалами и жевательными резинками [33, 34, 35]. Аллергия к золоту, ртути, палладию и меди часто обнаруживается у пациентов с лихеноидными повреждениями в ротовой полости [24, 30, 31, 25]. Соли металлов или акрилаты могут стать причиной изъязвлений [32]. Контактная сенсибилизация никелем, ртутью и другими металлами приводит к образованию бледных гиперкератотических повреждений, которые напоминают лейкоплакию. Осложнения в виде гранулематоза наблюдаются при контактной аллергии на ртуть или золото [36]. Отеки могут развиваться внезапно в результате реакции на латекс и сопровождаться сильным зудом, в тяжелых случаях может присоединиться обструкция верхних дыхательных путей [37].

Аллергия на латекс, также как и на компоненты зубных протезов из металлических сплавов, может проявляться не только местной, но и удаленной от места контакта реакцией в виде контактного дерматита или контактной крапивницы [24, 38].

Методы диагностики аллергических реакций в стоматологии

Для выявления аллергических реакций на лекарственные препараты, пломбировочные и стоматологические конструкционные материалы используется комплекс методов *in vivo* и *in vitro* диагностики.

К методам *in vivo* относятся:

- кожные пробы (капельный, скарификационный, прик-, патч-тесты);
- провокационные пробы (тест торможения естественной эмиграции лейкоцитов *in vivo* (по А.Д. Адо); градуированная (дозированная) провокация).

«Золотым стандартом» для определения лекарственной аллергии считаются провокационные методы. В случае необходимости выявления сенсибилизации к метал-

лам или другим стоматологическим материалам лучшим признан аппликационный метод — патч-тестирование.

В силу того, что исследования, проводимые *in vivo*, нельзя считать безопасными для пациента, а для применения этих тестов существуют строгие показания и противопоказания, рекомендуется при наличии у пациента в анамнезе аллергических реакций применять лабораторную *in vitro* диагностику для выявления возможной сенсибилизации к протезным материалам или лекарственным препаратам.

Достоверность современных методов лабораторной диагностики варьирует в пределах 60–85% в зависимости от исследуемого вещества и механизма гиперчувствительности.

Согласно классификации Джелла и Кумбса, выделяют 4 типа реакций гиперчувствительности, которые различаются по иммунологическим механизмам, времени развития и клиническим проявлениям (табл. 3).

Реакции гиперчувствительности на лекарственные препараты, применяемые в стоматологии, металлы и другие стоматологические материалы, как правило, развиваются по I или IV типу аллергических реакций, чаще по IV типу, или вообще без участия иммунных механизмов (псевдоаллергия).

I тип АР — гиперчувствительность немедленного типа опосредуется антителами класса IgE, реже IgG4. При первом контакте с аллергеном реакция не развивается, но происходит сенсибилизация и выработка специфических к данному аллергену IgE антител и их соединение с рецепторами тучных клеток и базофилов. Важную регуляторную роль в этом процессе играют Т-лимфоциты (Th2) и синтезируемые ими цитокины ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-13. При повторном контакте с аллергеном и соединении его со специфическими IgE антителами происходит активация тучных клеток и базофилов с последующей дегрануляцией и выбросом гистамина и других медиаторов воспаления в межклеточное пространство. На определении IgE антител, гистамина и других воспалительных субстанций и основаны методы лабораторной диагностики I типа АР. К ним относятся иммуноферментный анализ (ИФА), радиоиммунный анализ (РИА), радиоаллергосорбентный тест (РАСТ), ИммуноСАР, тест Шелли и его модификации, метод точной цитофлюориметрии.

IV тип АР — гиперчувствительность замедленного типа. Эти реакции протекают без участия антител. Они обусловлены взаимодействием Т-лимфоцитов (Th1) с аллергеном. Сенсибилизированные лимфоциты, несущие на своей поверхности специфические рецепторы, распознают аллерген на антигенпредставляющих клетках (макрофагах). Происходит стимуляция лимфоцитов и высвобождение лимфокинов, опосредующих развитие гиперчувствительности замедленного типа, в частности, фактор торможения миграции лейкоцитов (МИФ) и фактор пролиферации лимфоцитов. В результате образуются цитотоксические Т-лимфоциты (CD8),

Таблица 3. Методы лабораторной диагностики аллергических реакций на лекарственные препараты и стоматологические материалы

| Тип аллергической реакции | Эффекторы | Диагностические методы | Потенциальные аллергены |
|--|--|--|---|
| I — гиперчувствительность немедленного типа (реагиновый) | IgE-антитела, IgG4-антитела | ИФА, РИА, РАСТ, ImmunoCap, тест Шелли и модификации | Антибиотики, анальгетики, анестетики, витамины, салицилаты, сульфаниламиды, латекс |
| II — цитотоксический | IgG-антитела, IgM-антитела, комплемент | ИФА, реакция преципитации в агаре, проба Кумбса, тест связывания комплемента | Сульфаниламиды, аминогликозидные антибиотики |
| III — иммуно-комплексный | Иммунные комплексы, комплемент | ИФА, РИД, определение иммунных комплексов | Сульфаниламиды, пиразолоновые производные, местные анестетики |
| IV — гиперчувствительность замедленного типа | Сенсибилизированные Т-лимфоциты | РБТЛ, РТМЛ, проточная цитометрия, тест цитотоксичности лимфоцитов | Антибиотики, местные анестетики, галотан, алколоиды, сульфаниламиды, противосудорожные препараты, НПВС, пломбирочные и протезные материалы, металлы, латекс |

Сокращения: ИФА — иммуноферментный анализ; РИА — радиоиммунологический анализ; РАСТ — радиоаллергосорбентный тест; РИД — радиальная иммунодиффузия; РБТЛ — реакция бласттрансформации лимфоцитов; РТМЛ — реакция торможения миграции лейкоцитов; НПВС — нестероидные противовоспалительные средства.

которые лизируют клетки-мишени, несущие на своей поверхности аллерген, чем вызывают повреждение тканей. Скопление в тканях макрофагов приводит к образованию гранулем. Методы диагностики IV типа АР: реакция бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ), реакция торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ), метод цитотоксичности Т-лимфоцитов, проточная цитофлуориметрия.

Все вышеперечисленные методы используются для выявления аллергических реакций на антибиотики, анальгетики, анестетики, металлы, акрилаты, латекс и другие материалы и препараты, применяемые в стоматологии.

Самым распространенным, «рутинным» методом лабораторной диагностики является **иммуноферментный анализ (ИФА)**. С его помощью можно определять антитела, в том числе IgE, в сыворотке больного, компоненты комплемента, интерлейкины, лейкотриены, разнообразные маркеры воспаления и факторы иммунитета. Причем в качестве исследуемого материала может выступать не только сыворотка крови, но и другие биологические жидкости. В основе иммуноферментного анализа лежит связывание исследуемой субстанции, например, антитела с антигеном (аллергеном), соединенным с твердой фазой. Образовавшийся иммунный комплекс обрабатывается конъюгатом (анти-IgE-антителами, связанными с ферментом — пероксидазой или щелочной фосфатазой). Фермент, вступая во взаимодействие с субстратом (тетраметилбензидином — ТМБ), добав-

ляемым на последней стадии анализа, развивает цветную реакцию. По степени окрашивания можно судить о наличии и количестве связавшихся антител. Учет реакции производится измерением оптической плотности на микропланшетном иммуноферментном анализаторе. Метод иммуноферментного анализа обладает хорошей чувствительностью и высокой специфичностью.

ИФА используется для выявления аллергии к антибиотикам, местным анестетикам, анальгетикам, миорелаксантам, НПВС, эпинефрину, металлам, профессиональным аллергенам (латексу, формальдегиду, хлорамину Т, фталевому ангидриду).

Для диагностики специфических IgE антител в сыворотке крови пациентов применяются также **тест Шелли** и его модификации.

Принцип метода заключается в том, что лейкоциты доноров или тучные клетки крыс инкубируются с сывороткой крови пациента. При этом происходит связывание Fc-фрагментов специфических IgE антител из сыворотки крови пациента с Fc-рецепторами на поверхности базофилов доноров или тучных клеток крыс. Таким пассивным путем клетки-мишени сенсибилизируются к аллергенам, против которых направлены специфические IgE антитела. При добавлении исследуемого аллергена в клеточную среду происходит его связывание с IgE антителами на поверхности базофилов или тучных клеток с последующей их активацией и дегрануляцией. Результат реакции оценивается по высвобождению гистамина из клеток-мишеней.

Чувствительность теста 93%, специфичность недостаточна высокая.

Существует более современный и специфичный метод оценки активации и дегрануляции базофилов — **метод проточной цитофлюориметрии**, основанный на определении маркеров активации (CD203c) и дегрануляции (CD63) базофилов, образующихся на поверхности клеток после их инкубации с сывороткой крови пациента и стимуляции аллергеном.

Принцип проточной цитометрии состоит в том, что суспензию клеток, предварительно меченных моноклональными антителами, конъюгированными с флюорохромом, под большим давлением прогоняют через капилляр, где она проходит сквозь световой пучок — лазерный луч. Происходит рассеивание света, которое фиксируют высокочувствительные датчики. Одновременно фиксируется свечение флюоресцентных меток, имеющее строго определенную для каждого флюорохрома длину волны, что позволяет производить анализ нескольких параметров. Световые сигналы преобразуются в электрические, обрабатываются, что в конечном итоге позволяет определить количественную величину каждого измеряемого параметра. Использование многоцветного флюориметрического исследования позволяет одновременно получить информацию о размере клеток, характере включений и гранулярности, а также определить антигенный профиль клеточной поверхности. Этот метод обладает высокой чувствительностью и специфичностью и позволяет определить активацию базофилов, лимфоцитов или любых других клеток на самой ранней стадии ее развития [39, 40, 41, 42].

Среди лабораторных методов диагностики IV типа аллергических реакций (ГЗТ) наиболее специфичными считаются тест пролиферации лимфоцитов и реакция торможения миграции лейкоцитов.

Реакция бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) заключается в измерении пролиферативного ответа лимфоцитов на фактор активации (аллерген). К лимфоцитам, выделенным из крови пациента, добавляются радиоактивная метка НЗ-тимидин и стимулятор деления, т. е. исследуемый материал, например, соль металла в виде раствора определенной концентрации.

Включение НЗ-тимидина в состав синтезируемой ДНК во время активной пролиферации лимфоцитов и накопление его внутри клеток позволяют количественно оценить пролиферативный ответ, измеряя накопленную радиоактивность через 6 дней на сцинтилляционном счетчике. Индекс стимуляции равен отношению количества радиоактивности в пробе с исследуемым материалом к контролю (количеству радиоактивности в пробе без аллергена).

Диагностическая эффективность РБТЛ при исследовании аллергии на пенициллин составляет 75%.

По некоторым данным, определение повышенной чувствительности к металлам с помощью теста проли-

ферации лимфоцитов соответствует результатам патч-тестирования или, в некоторых случаях, даже лучше отражает истинную реакцию организма на имплантируемый материал [43, 44, 45, 46, 27]. Однако метод имеет ограничения в применении, например, у больных с заболеваниями печени, ферментопатиями, с непереносимостью нестероидных противовоспалительных средств (НПВС) результаты РБТЛ могут быть отрицательными. Длительность тестирования (6 дней) и использование радиоактивности тоже создают определенные неудобства для его применения.

Еще один *in vitro* тест, используемый для диагностики гиперчувствительности замедленного типа, это **реакция торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ)**, или определение фактора торможения миграции (МИФ). МИФ препятствует миграции лейкоцитов из зоны, где находится чужеродный антиген, поэтому обнаружение МИФ в опыте указывает на активный иммунный ответ и повышенную чувствительность к аллергену, используемому в опыте. Тест заключается в выделении лейкоцитов из крови пациента и добавлении к ним растворов с исследуемыми лекарственными препаратами или солями металлов. Результат тестирования считается положительным, если миграции лейкоцитов из зоны контакта с аллергеном не происходит, и наоборот. Существует несколько модификаций теста, такие как торможение миграции макрофагов или лимфоцитов. Постановка теста может осуществляться в капиллярах, камере Бойдена, под агарозой или в коллагеновом геле [47]. Наиболее распространенный метод — капиллярный. Хорошо зарекомендовал себя метод в камере Бойдена в исследованиях по изучению сенсибилизации к металлам у ортопедических пациентов. По данным авторов, положительные результаты теста у пациентов с металлическими имплантами хорошо коррелировали с клиническими проявлениями аллергической реакции. После удаления имплантов симптомы улучшались и результаты теста нормализовались [47, 48]. Возможно, проведение подобных исследований в области стоматологии могло бы оказаться не менее интересным и полезным.

Специфичность РТМЛ на лекарственные препараты составляет 76,9%, чувствительность — 95,2%.

Как уже отмечалось выше, для определения активации лимфоцитов можно использовать **метод проточной цитофлюориметрии**. Он не требует такого длительного периода времени для проведения анализа и работы с радиоактивностью, как реакция бласттрансформации лимфоцитов. О наличии сенсибилизации судят по разнице процентного содержания CD69+ лимфоцитов и CD25+ лимфоцитов относительно отрицательного контроля. Активацию лимфоцитов можно диагностировать уже на первые сутки после введения аллергена в пробу крови обследуемого пациента, так как экспрессия молекул активации CD69 на мембране стимулированных лимфоцитов уже имеет место [49, 42].

Методы лабораторной диагностики псевдоаллергических реакций

Далеко не все побочные нежелательные реакции пациентов на тот или иной лекарственный препарат или протезные и пломбирочные материалы имеют в своей основе истинно аллергические механизмы развития. По данным различных исследователей, аллергические реакции на лекарства составляют лишь 6–10% из всех наблюдаемых побочных эффектов. Остальные развиваются вследствие псевдоаллергических механизмов, ферментопатий, токсического действия препарата или его передозировки [50, 10].

Псевдоаллергические реакции (ПР) вызывают те же клинические симптомы, что и истинные аллергические реакции, но отличаются по механизмам своего развития [12]. Причиной развития ПР является прямое воздействие аллергена без участия антител на тучные клетки или базофилы, их активация и дегрануляция, в результате которых происходит выброс гистамина и других биологически активных веществ, вызывающих дальнейшее развитие патохимической и патофизиологической стадий, как и в случае аллергической реакции. Основное отличие псевдоаллергических реакций от аллергических — в отсутствии иммунологической стадии, то есть синтеза антител и сенсибилизации Т-лимфоцитов. Активация клеток происходит, вероятно, через Toll-подобные рецепторы, которые находятся на поверхности практически всех лейкоцитов, эпителиоцитов, дендритных и тучных клеток. Они относятся к механизмам врожденного иммунитета и отвечают, в первую очередь, за связывание бактериальных антигенов с последующей передачей сигнала внутрь клетки для запуска синтеза и высвобождения провоспалительных медиаторов и цитокинов [51, 52]. По-видимому, за счет перекрестного реагирования с Toll-подобными рецепторами могут связываться антигены не только бактериального происхождения. Так, в недавних исследованиях было показано, что никель (Ni 2+) способен активировать Toll-подобные рецепторы 4 (TLR4) человека напрямую, без участия специфических Т-лимфоцитов, вызывая развитие воспалительного ответа с клиническими симптомами контактной гиперчувствительности [53].

Псевдоаллергические реакции также способны вызывать местные анестетики, антибиотики пенициллинового ряда, анальгетики, особенно ацетилсалициловая кислота. Они могут наблюдаться при первичном введении в организм рентгеноконтрастных веществ, опиатов, миорелаксантов и других препаратов [2].

Большинство методов диагностики псевдоаллергических реакций *in vitro* направлены на определение маркеров активации лейкоцитов большого после или в процессе их инкубации с растворами тестируемых препаратов («нагрузочные тесты»).

Некоторые тесты хорошо известны и используются уже в течение многих лет, такие как: 1) тест дегрануляции базофилов с окрашиванием их специальными ще-

лочными красителями после проведения стимуляции аллергеном; 2) реакция лейкоцитолитиза; 3) показатель повреждаемости нейтрофилов по В.А. Фрадкину; 4) реакция агломерации лейкоцитов; 5) реакция хемиллюминесценции лейкоцитов; 6) группа методов, основанная на определении активации лейкоцитов по освобождению ими в культуральную жидкость гистамина, пероксидазы, триптазы, ионов калия.

Эти методы отработаны в условиях отдельных лабораторий для определенной группы лекарственных препаратов или других химических соединений. Однако они не всегда имеют хорошую воспроизводимость, высокую специфичность и чувствительность.

В настоящее время предлагаются современные, стандартизированные и обладающие высокой чувствительностью и специфичностью методы лабораторной диагностики:

CAST (Cellular Antigen Stimulation Test) — ELISA — тест антигенной стимуляции базофилов, основанный на определении сульфидолейкотриенов (LTC₄, LTD₄, LTE₄), секретируемых ими в культуральную жидкость. Также его называют провокационным тестом *in vitro*.

Лейкотриены относятся к эйкозаноидам — продуктам метаболизма арахидоновой кислоты и выделяются в среду в течение 5–10 минут после активации тучных клеток и базофилов. Лейкотриены — очень сильные медиаторы аллергических и воспалительных процессов, оказывающие действие уже в наномолярных концентрациях. Три лейкотриена LTC₄, LTD₄ и LTE₄ образуют медленно реагирующую субстанцию анафилаксии. Они стимулируют сокращение гладких мышц бронхов, секрецию слизи и повышают проницаемость сосудов.

Метод CAST®-ELISA основан на активации базофилов пациента исследуемым аллергеном и интерлейкином-3 (ИЛ-3), выступающим в данном случае в роли кофактора, с последующим определением в культуральной жидкости сульфидолейкотриенов (LTC₄, LTD₄, LTE₄). Концентрация лейкотриенов определяется с помощью иммуноферментного анализа, что позволяет его использовать практически в любой лаборатории. Метод стандартизирован, обладает высокой специфичностью по сравнению с классическим тестом высвобождения гистамина. Для различных лекарственных препаратов чувствительность метода составляет 53–90%, а специфичность — 89–100%.

FLOW-CAST® — метод оценки активации базофилов с помощью проточной цитометрии. Этапы выделения лейкоцитов и стимуляции аллергеном для обоих вариантов, иммуноферментного и цитометрического, идентичны. Но вместо лейкотриенов на третьем этапе FLOW-CAST® определяется количество активированных базофилов, экспрессирующих на своей поверхности антиген CD63. CD63 является классическим маркером дегрануляции. Эта молекула расположена на мембране базофильных гранул и при дегрануляции в результате слияния гранул с цитоплазматической мем-

браной CD63 оказывается на поверхности клетки. При активации базофилов экспрессия CD63 увеличивается на 100%. Тест высоко чувствителен и специфичен, особенно при лекарственной гиперчувствительности.

CAST®-ELISA и FLOW-CAST® могут быть использованы также для диагностики I типа реакций гиперчувствительности. В этом случае вместо лейкоцитов больного используются клетки донора, обработанные сывороткой пациента. Все последующие этапы тестирования идентичны. Таким образом, данные методы можно отнести к универсальным способам оценки аллергических и псевдоаллергических реакций на лекарственные препараты или стоматологические материалы.

Аутоиммунные заболевания с симптомами в ротовой полости и их диагностика

Кроме аллергических и псевдоаллергических осложнений, в своей практике врачи-стоматологи могут встретиться и с другими иммунопатологическими состояниями, в основе которых лежит аутоиммунный компонент, например, синдром Шегрена, болезнь Крона, аутоиммунные дерматозы с поражением слизистой оболочки ротовой полости (пузырчатка, пемфигоид), системная красная волчанка и др.

Все эти заболевания имеют среди клинических признаков патологические изменения в ротовой полости. Во многих случаях эти поражения являются общими для целого ряда патологий и требуют дифференциальной диагностики или проявляются на ранних стадиях развития основного заболевания, когда еще не сформировались главные диагностические критерии. Неэффективность проводимого лечения должна в таких случаях служить сигналом о необходимости уточнения диагноза и назначения пациенту лабораторного исследования.

Синдром Шегрена (СШ) является ревматическим заболеванием, протекающим с поражением слюнных и слезных желез. Распространенность СШ варьирует от 0,1 до 3,0% в общей популяции и от 3,0 до 5,0% среди лиц старше 50 лет, преимущественно у женщин. Основными клиническими признаками СШ являются сухой кератоконъюнктивит и хронический паренхиматозный сиалоденит. Среди стоматологических признаков заболевания выделяют ксеростомию, увеличение слюнных желез, паротит, стоматит, лимфаденопатию, сухость красной каймы губ, заеды, множественный пришеечный кариес. Симптомы СШ обнаруживаются у 5–25% больных с системными заболеваниями соединительной ткани, такими как ревматоидный артрит (РА) и системная красная волчанка (СКВ), у 50–75% больных с хроническими аутоиммунными поражениями печени и щитовидной железы [54].

К основным аутоиммунным механизмам развития СШ относятся лимфоцитарная инфильтрация эпителиальных желез и поликлональная В-клеточная активация, приводящая к образованию большого количества аутоантител, преимущественно IgG и IgM классов. Ди-

агностически значимыми являются антитела к рибонуклеопротеинам Ro/SS-A и La/SS-B [55]. Совместное обнаружение этих видов антинуклеарных антител обладает высокой специфичностью при данном заболевании. Комбинация обеих разновидностей антител нередко сочетается с высокими титрами ревматоидного фактора, гипергаммаглобулинемией и криоглобулинемией. Среди других проявлений аутоиммунного процесса при СШ обнаружение антител к протокам слюнных желез, париетальным клеткам слизистой желудка, нейтрофильным цитоплазматическим антигенам и к митохондриям [56].

Антитела к Ro/SS-A и La/SS-B антигенам достаточно хорошо определяются в иммуноблоте, ревматоидный фактор — с помощью реакции агглютинации с латексом, остальные виды аутоантител выявляются методом непрямой иммунофлюоресценции с использованием различных субстратов.

Болезнь Крона

Одним из 3 основных диагностических критериев **болезни Крона** является обнаружение у пациента множественных небольших афтозных изъязвлений в верхних и нижних отделах пищеварительного тракта, при этом в ротовой полости диагностируется афтозный стоматит [57]. Патогенетическим механизмом развития заболевания считается потеря толерантности к антигенам пищи и развитие повышенной иммунореактивности на пищевые антигены, а также на антигены микрофлоры кишечника и ротовой полости. Для диагностики болезни Крона используется определение антител IgG и IgA к *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA). Основным методом выявления ASCA является непрямая иммунофлюоресценция на клетках дрожжей, также могут использоваться ИФА-тест системы. При определении одновременно двух классов иммуноглобулинов специфичность тестирования составляет 93% [56].

Аутоиммунные дерматозы

Характерным признаком **пузырчаток** является образование внутриэпидермальных пузырьков как результат разрушения межклеточных структур — десмосом и образования интраэпителиальных полостей с акантолитическими клетками. Механизм патологического процесса заключается в образовании аутоантител к десмоглеинам — молекулам межклеточной адгезии, которые содержатся в десмосомах и способствуют прочности межклеточных контактов. Определение антител к десмоглеинам лежит в основе *in vitro* диагностики пузырчаток. Пузырчатка простая (*Pemphigus vulgaris*), в отличие от других форм пузырчаток, характеризуется преимущественным поражением слизистой оболочки ротовой полости и образованием антител к десмоглеину 3-го типа (Dsg3) [58].

Ротовая полость поражается также при **пемфигоиде слизистых оболочек** в 85% случаев. Во рту формируются везикулобуллезные образования и почти без-

болезненные эрозии, которые не мешают принятию пищи. Наиболее частой манифестацией заболевания является десквамативный гингивит. В отличие от пузырчатки, при пемфигоиде антитела синтезируются к гемидесмосомам базальной мембраны, вернее, к их антигенам ВРАG1 и ВРАG2. Поэтому полости образуются на границе эпидермиса и дермы, акантолитические клетки отсутствуют [58].

Лабораторная диагностика аутоиммунных дерматозов должна обязательно включать исследование биопсии кожи с помощью прямой реакции иммунофлюоресценции (РИФ). Изучение отложений иммуноглобулинов и факторов комплемента очень информативно. Прямое иммунофлюоресцентное обследование биопсии непораженного участка кожи является «золотым стандартом» в диагностике пузырных дерматозов и обладает почти 100% чувствительностью. При этом исследовании выявляются антитела класса IgG к десмоглеинам при пузырчатке, антитела класса IgG и IgA к базальной мембране при пемфигоиде. Аутоантитела к десмосомам и базальной мембране можно также обнаружить с помощью непрямой РИФ на криосрезах пищевода обезьяны, используя в качестве исследуемого материала сыворотку пациента [56].

Системная красная волчанка

Трудности, связанные с диагностикой системной красной волчанки (СКВ), в первую очередь определяются многообразием клинической симптоматики заболевания. К основным диагностическим критериям по классификации Американского ревматологического колледжа относятся эритематозные пятна с кератоидными чешуйками, сыпь на коже, особенно характерная на лице в области скул, фоточувствительность и язвенные поражения ротовой и носоглоточных полостей [59, 60]. Язвы во рту встречаются у 8,9% больных СКВ. Полиморфизм клинических симптомов заболевания не позволяет поставить диагноз СКВ без использования лабораторных методов.

В патогенезе СКВ ведущую роль играет образование аутоантител, особенно антиядерных антител, а также циркулирующих иммунных комплексов, которые, откладываясь на базальных мембранах, вызывают их повреждение с дальнейшим развитием воспалительной реакции. Основным методом иммунодиагностики СКВ является определение антиядерного фактора (АНФ) на клеточной линии HEp-2. АНФ обнаруживается у 98% больных с этим заболеванием. В скрининг СКВ в обязательном порядке входит также определение антител к дсДНК (ИФА-тест) и к Sm антигену (ИФА, иммуноблот) [56, 61].

Заключение

В заключение хотелось бы отметить, что лабораторная диагностика является полезным и часто незаменимым инструментом для врача-стоматолога, несмотря

на все трудозатраты, необходимость приобретения дорогостоящих тест-систем и оборудования. Использование вышеописанных методов лабораторной диагностики аллергических и псевдоаллергических реакций отменяет необходимость проведения провокационных и кожных тестов *in vivo*, тем самым снижает риск для жизни и здоровья пациента, а диагностика большинства аутоиммунных заболеваний вообще невозможна без лабораторных исследований.

С другой стороны, никакие лабораторные анализы нельзя рассматривать отдельно от клинической картины заболевания. Только комплексная оценка всей информации и совместная работа врачей и сотрудников лаборатории помогут достичь положительного результата, а именно — правильной постановки диагноза и оказания квалифицированной помощи больному.

Литература

1. Лусс Л.В. Этиология, патогенез, проблемы диагностики и лечения аллергического ринита. РМЖ. 2003; 11 (12): 718–729.
2. Аллергология и иммунология: Национальное руководство / Под ред. акад. РАМН проф. Р.М. Хаитова, проф. Н.И. Ильиной. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009: 656.
3. Клиническая аллергология: Руководство для практических врачей / Под ред. акад. РАМН проф. Р.М. Хаитова. М.: МЕДпресс-информ, 2002: 624.
4. Хаитов Р.М., Богова А.В., Ильина Н.И. Эпидемиология аллергических заболеваний России. Иммунология. 1998; 3: 4–9.
5. Балаболкин И.И., Ефимова А.А., Авдеев Н.В. Влияние экологических факторов на распространенность и течение аллергических болезней. Иммунология. 1991; 4: 34–36.
6. Baluga J.C., Casamayou R., Carozzi E. et al. Allergy to local anaesthetics in dentistry. Myth or reality? *Allergol. et Immunopathol.* 2002; 30 (1): 14–19.
7. Dhanuthai K., Sappayatosok K., Bijaphala P., Kulvit S., Sereerat T. Prevalence of medically compromised conditions in dental patients. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.* 2009, Jun 1. 14 (6): 287–291.
8. Gawkrödger D.J. Investigation of reactions to dental materials. *Br. J. Dermatol.* 2005, Sep; 153 (3): 479–485.
9. Kanerva L., Estlander T., Jolanki R. Occupational skin allergy in the dental profession. *Dermatol. Clin.* 1994, Jul; 12 (3): 517–532.
10. Munksgaard E.C. Toxicology versus allergy in restorative dentistry. *Adv. Dent. Res.* 1992; 6: 17–21.
11. Астафьева Н.Г., Горячкина Л.А. Лекарственная аллергия (часть 1). Аллергология. 2000; 2: 40–50.
12. Лусс Л.В. Аллергия и псевдоаллергия в клинике. Сб. трудов: Современные проблемы аллергологии, клинической иммунологии и иммунофармакологии. М., 1998: 45–58.
13. Мясникова Т.Н. Распространенность, особенности клинического течения, диагностика лекарственной непереносимости: дисс. ... канд. мед. наук. М., 2004: 116.
14. Hasan A.A., Ciancio S. Association between ingestion of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the emergence of aphthous-like ulcers. *J. Int. Acad. Periodontol.* 2009, Jan; 11 (1): 155–159.
15. Патология челюстно-лицевой области: Учебное пособие в 2 частях / Под ред. проф. Е.В. Маркеловой и проф. Е.В. Красникова. 2005; 1: 156.
16. Голая Л.Д. Аллергические и токсико-химические стоматиты, обусловленные материалами зубных протезов: метод. пособие для врачей-стоматологов. М., 2000; 31.
17. Жолудев С.Е. Клиника, диагностика, лечение и профилактика явлений непереносимости акриловых зубных протезов: автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. Екатеринбург, 1998: 41.

18. *Jainkittivong A., Langlais R.P.* Allergic stomatitis. *Semin. Dermatol.* 1994; 13 (2): 91–101.
19. *Sicilia A., Cuesta S., Coma G.* et al. Titanium allergy in dental implant patients: a clinical study on 1500 consecutive patients. *Clin. Oral Implants Res.* 2008, Aug; 19 (8): 823–835.
20. *Triantos D.* Intra-oral findings and general health conditions among institutionalized and non-institutionalized elderly in Greece. *J. Oral Pathol. Med.* 2005, Nov; 34 (10): 577–582.
21. *Garner L.A.* Contact dermatitis to metals. *Dermatol. Ther.* 2004; 17 (4): 321–327.
22. *Van Hoogstraten I.M., Andersen K.E., Von Blomberg B.M.* et al. Reduced frequency of nickel allergy upon oral nickel contact at an early age. *Clin. Exp. Immunol.* 1991, Sep; 85 (3): 441–445.
23. *Basko-Plluska J.L., Thyssen J.P., Schalock P.C.* Cutaneous and systemic hypersensitivity reactions to metallic implants. *Dermatitis.* 2011, Apr. 22 (2): 65–79.
24. *Hosoki M., Bando E., Asaoka K., Takeuchi H., Nishigawa K.* Assessment of allergic hypersensitivity to dental materials. *Bio-Medical Materials and Engineering.* 2009; 19: 53–61.
25. *Raap U., Stiesch M., Reh H., Kapp A., Werfei T.* Investigation of contact allergy to dental metals in 206 patients. *Contact Dermatitis.* 2009, Jun; 60 (6): 339–343.
26. *Thyssen J.P., Menne T.* Metal allergy — a review on exposures, penetration, genetics, prevalence, and clinical implications. *Chem. Res. Toxicol.* 2010, Feb; 23 (2): 309–318.
27. *Yamanaka S.* Metal allergy and its screening methods associated with dental practice. *Dentistry in Japan.* 2002; 38: 187–194.
28. *Yamanaka S., Ohta K., Takayanagi A.* et al. Evaluation of patch tests as a screening method for allergy associated with dental metals. *J. Dent. Health.* 1997; 47: 27–35.
29. *Faurshou A., Menne T., Johansen J.D., Thyssen J.P.* Metall allergen of the 21st century — a review on exposure, epidemiology and clinical manifestations of palladium allergy. *Contact Dermatitis.* 2011, Apr.; 64 (4): 185–195.
30. *Koch P., Bahmer F.A.* Oral lichenoid lesions, mercury hypersensitivity and combined hypersensitivity to mercury and other metals: histologically-proven reproduction of the reaction by patch testing with metal salts. *Contact Dermatitis.* 1995, Nov; 33 (5): 323–328.
31. *Moller H.* Dental gold alloys and contact allergy. *Contact Dermatitis.* 2002, Aug; 47 (2): 63–66.
32. *Kobayashi T., Sakuraoka K., Hasegawa Y., Konohana A., Kurihara S.* Contact dermatitis due to an acrylic dental prosthesis. *Contact Dermatitis.* 1996, Dec; 35 (6): 370–371.
33. *Garcia-Bravo B., Pons A., Rodriguez-Pichardo A.* Oral lichen planus from colophony. *Contact Dermatitis.* 1992, Apr; 26 (4): 279.
34. *Lamey P.J., Lewis M.A., Rees T.D., Fowler C., Binnie W.H., Forsyth A.* Sensitivity reaction to the cinnamonaldehyde component of toothpaste. *Br. Dent. J.* 1990, Feb; 168 (3): 115–118.
35. *Lopez-Lerma I., Vilaplana J., Romaguera C.* Intraoral contact allergy to camphoroquinone. *Contact. Dermatitis.* 2008, Dec; 59 (6): 377–378.
36. *Tosti A., Pazzaglia M., Piraccini B.M.* Contact stomatitis. *Medscape reference.* 2009, Oct. <http://emedicine.medscape.com/article/1076589-clinical>
37. *Bousquet J., Flahault A., Vandenplas O.* et al. Natural rubber latex allergy among health care workers: a systematic review of the evidence. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006; 118 (2): 447.
38. *Liss G.M., Sussman G.L., Deal K.* et al. Latex allergy: epidemiological study of 1351 hospital workers. *Occup. Environ. Med.* 1997; 54 (5): 335.
39. *Abuaf N., Rostane H., Rajoely B.* et al. Comparison of two basophil activation markers CD63 and CD203c in the diagnosis of amoxicillin allergy. *Clin. Exp. Allergy.* 2008, Jun. 38 (6): 921–928.
40. *Hausmann O.V., Gentinetta T., Bridts C.H., Ebo D.G.* The basophil activation test in immediate-type drug allergy. *Immunol. Allergy. Clin. North. Am.* 2009, Aug; 29 (3): 555–566.
41. *Leysen J., Sabato V., Verweij M.M., De Knop K.J., Bridts C.H., De Clerck L.S., Ebo D.G.* The basophil activation test in diagnosis of immediate drug hypersensitivity. *Expert. Rev. Clin. Immunol.* 2011, May; 7 (3): 349–355.
42. *Romano A., Demoly P.* Recent advances in the diagnosis of drug allergy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2007, Aug; 7 (4): 299–303.
43. *Carando S., Cannas M., Rossi P., Portigliatti-Barbos M.* The lymphocytic transformation test (L.T.T.) in the evaluation of intolerance in prosthetic implants. *Ital. J. Orthop. Traumatol.* 1985, Dec. 11 (4): 475–481.
44. *Donati M.E., Savarino L., Granchi D.* et al. The effects of metal corrosion debris on immune system cells. *Chir. Organi. Mov.* 1998, Oct-Dec. 83 (4): 387–393.
45. *Granchi D., Ciapetti G., Stea S.* et al. Evaluation of several immunological parameters in patients with aseptic loosening of hip arthroplasty. *Chir. Organi Mov.* 1995, Oct-Dec; 80 (4): 399–408.
46. *Valentine-Thone E., Muller K., Guzzi G.* et al. LTT-MELISA is clinically relevant for detecting and monitoring metal sensitivity. *Neuro Endocrinol. Lett.* 2006, Dec; 27 (1): 17–24.
47. *Hallab N., Jacobs J.J., Black J.* Hypersensitivity to metallic biomaterials: a review of leucocyte migration inhibition assays. *Biomaterials.* 2000, Jul; 21 (13): 1301–1314.
48. *Merritt K., Brown S.A.* Metal sensitivity reactions to orthopedic implants. *Int. J. Dermatol.* 1981, Mar. 20 (2): 89–94.
49. *Титова Л.Д., Сидорович И.Г.* Диагностика лекарственной аллергии in vitro. Тезисы доклада на Международный конгресс «Иммунитет и болезни: от теории к терапии». М., 3–7 октября 2005.
50. *Маломед С.* Аллергические и токсические реакции на местные анестетики. *Клиническая стоматология.* 2004; 4: 27–31.
51. *Лебедев К.А., Понякина И.Д., Митронин А.В.* и др. Аллергические реакции на местные анестетики и методы их диагностики. *Стоматология для всех.* 2005; 3: 11.
52. *Лебедев К.А., Понякина И.Д.* Новый этап развития иммунологии. *Природа.* 2006; 4: 3–10.
53. *Schmidt M., Raghavan B., Muller V.* et al. Crucial role for human Toll-like receptor 4 in the development of contact allergy to nickel. *Nature Immunology.* 2010; 11: 814–819.
54. *Васильев В.И.* Клиника, диагностика и дифференциальная диагностика болезни Шегрена. *РМЖ.* 2008; 16 (10): 638–648.
55. *Vitali C., Bombardieri S., Jonsson R.* et al. Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann. Rheum. Dis.* 2002; 61: 554–558.
56. *Лалин С.В., Толоян А.А.* Иммунологическая лабораторная диагностика аутоиммунных заболеваний. СПб.: Человек, 2010: 272.
57. *Yao T., Matsui T., Hiwataishi N.* Crohn's disease in Japan: diagnostic criteria and epidemiology. *Dis. Colon. Rectum.* 2000, Oct; 43 (10): 85–93.
58. *Habif T.P.* Clinical dermatology: a color guide to diagnosis and therapy, 4th edition. Inc.: Mosby, 2004: 1004.
59. *Tan E.M., Cohen A.S., Fries J.F.* et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1982; 25: 1271–1277.
60. *Tan E.M., Cohen A.S., Fries J.F.* et al. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997; 40: 1725.
61. *Клиническая иммунология и аллергология / Под ред. Г. Лолора-младшего, Т. Фишера, Д. Адельмана.* М.: Практика, 2000: 806.

РОЛЬ ВИРУСНЫХ ПАТОГЕНОВ В РАЗВИТИИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

А.Б. ЧУХЛОВИН

ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский Государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздравсоцразвития России,

кафедра клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины

Резюме. В обзоре рассматриваются результаты оценки распространенности и частоты выявления вирусов, главным образом, группы герпеса, при острых и хронических заболеваниях пародонта. На основании ранее опубликованных данных проведен сравнительный анализ частоты встречаемости вирусов простого герпеса, Эпштейна–Барр, а также цитомегаловируса в поддесневом зубном налете и десневой жидкости у лиц с острыми и хроническими воспалительными процессами пародонта. Констатирована слабая изученность роли других герпесвирусов (герпеса типов 6 и 8), а также папилломавируса в качестве патогенных факторов или маркеров нарушений иммунной функции. В связи с разнообразием методик определения герпесвирусов проведено сопоставление данных о чувствительности различных методов их выявления. В плане перспектив клинического применения, чувствительности и специфичности диагностики герпесвирусов в гингивальных пробах наиболее пригодны различные варианты полимеразной цепной реакции ДНК (гнездная и real-time ПЦР), которые не менее эффективны, чем классическая методика клеточных культур. Рассматривается возможное значение вирусных инфекций как фактора, модифицирующего течение микробных пародонтитов. Показана, в частности, возможная роль вируса Эпштейна–Барр в поддержании бактериальных инфекций в десневой области. Обсуждаются возможные механизмы взаимодействия вирусной и бактериальной микробиот в эволюции пародонтитов.

Ключевые слова: герпесвирусы, пародонтит, бактериальная инфекция.

ROLE OF VIRAL PATHOGENA IN DEVELOPMENT OF INFLAMMATORY PERIODONTAL DISEASES

A.B. CHUKHLOVIN

**State budget educational institution of higher professional education “St. Petersburg Pavlov State Medical University”, Ministry of Health Care and social development; St. Petersburg, Russia
Department of Clinical Laboratory Diagnostics with a Course of Molecular Medicine**

Summary. The review article presents some results concerning prevalence and frequency of viral infections (mainly, herpesviruses) in acute and chronic periodontal disorders. As based on previously published data from available literature, a comparative analysis of herpesvirus detection rates was undertaken, with respect to the origin of biological samples (subgingival plaque vs. crevicular fluid), and virus types, i.e., herpes simplex, Epstein–Barr virus, and cytomegalovirus. Appropriate comparisons were performed for acute and chronic periodontal inflammation. Meanwhile, information about possible role of other herpesviruses (e.g., HHV 6 and 8) is rather scarce, like as clinical significance of papillomaviruses as potential pathogens, or markers of immune disfunction. Possible involvement of viral infections is suggested to be a modifying factor in progression of microbial periodontitis. Moreover, we consider a possible role of Epstein–Barr virus for maintenance of gingival bacterial infections. Probable mechanisms of viral-bacterial interactions are discussed in view of periodontitis evolution.

Keywords: herpesvirus, periodontitis, bacterial infection.

Данные для корреспонденции:

Чухловин Алексей Борисович, д. м. н., профессор кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины СПбГМУ им. И.П. Павлова, 197022, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, д. 6/8, тел./факс: (812) 499-71-94, e-mail: alexei.chukh@mail.ru

Введение

Как известно, полость рта уже с первых лет жизни заселяется различными микроорганизмами (у взрослых людей — более 500 видов), из которых некоторые считаются патогенными [1]. Многие из этих бактерий и грибов пока не поддаются культивированию и поэтому не идентифицированы. Посредством молекулярно-био-

логических методик пока обнаружены только их специфические ДНК, родство которых с известными видами оценивается путем анализа сходства определенных участков генома (например, генов 16S рРНК).

Что касается вирусных патогенов, то их значительно сложнее выявить классическими микробиологическими методами, особенно в столь сложной смеси, как

микробиота полости рта. Однако ситуация резко изменилась по мере появления молекулярно-биологической (ДНК)-диагностики, особенно с разработкой полимеразной цепной реакции (ПЦР). Уже несколько лет назад были расшифрованы нуклеотидные последовательности всех наиболее актуальных в клиническом плане вирусов. Некоторые из них часто встречаются в клинических образцах из ротовой полости. Соответственно, нуждается в изучении патогенетическая роль таких вирусов в развитии заболеваний полости рта, особенно воспалительных процессов [2].

Связь патогенных вирусов с очагами воспаления вполне естественна, если учесть, что большинство из них способны реплицироваться в лейкоцитах крови [1].

Вирус Эпштейна–Барр и цитомегаловирус в патологии пародонта

Существующие исследования стоматологического характера касаются, главным образом, трех наиболее актуальных герпесвирусов вируса простого герпеса (ВПГ), цитомегаловируса (ЦМВ) и вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ). При этом следует учитывать возможность кооперативных взаимодействий между бактериальным комплексом и вирусными агентами внутри микробиоты полости рта. Эти взаимодействия крайне сложны, и поэтому исследователи ограничиваются лишь определением ряда маркерных микроорганизмов и анализом межвидовых корреляций. Эти вопросы рассматриваются, например, в обзоре [3].

Так, определенные связи отмечены между клиническим течением пародонтитов и инфекционным процессом. В частности, еще в работе [4], где герпесвирусы выявляли в поддесневом материале методом гнездовой ПЦР, было показано, что степень тяжести ювенильного пародонтита (глубина десневых карманов) была связана как с наличием в поддесневой области *P. gingivalis*, так и с выявляемостью вируса Эпштейна–Барр и особенно — с наличием у больных цитомегаловируса.

Другое исследование ассоциаций герпесвирусов с бактериальными возбудителями проводилось группой Слотса [5]. Обследованы небольшие группы больных с пародонтитом и здоровых лиц. Материал для исследования брали из десневых карманов, выявление ДНК различных инфекционных патогенов проводили методом количественной ПЦР, проводилась детекция шести пародонтопатогенных бактерий, а также ЦМВ и ЭВБ. Авторы обнаружили, что ЭВБ, ЦМВ и бактерии выявлялись при пародонтитах намного чаще, чем в контроле.

При этом были обнаружены численные корреляции между содержанием указанных вирусов и рядом бактерий (*P. gingivalis* и *T. Forsythia*). Количество вирусов коррелировало со степенью отслоения десен, глубиной десневых карманов и кровоточивостью десен.

На основании этого небольшого исследования делаются предположения о возможных взаимодействиях

между герпесвирусами и специфическими бактериальными видами в патогенезе пародонтитов.

Известны, как минимум, два механизма возможного патогенного действия вирусов на фоне хронической бактериальной инфекции. Так, по мнению [3], герпесвирусы при инфекции пародонта могут нарушать местную иммунную защиту и, тем самым, повышать вирулентность пародонтопатогенных бактерий.

Вирусная инфекция может играть важную роль в развитии более тяжелых форм зубной патологии. Так, в статье [6] обосновывается существенная роль герпесвирусов в эволюции гингивита в пародонтит.

Учитывая общеизвестный факт, что герпесвирусы способны размножаться в клетках эпителия (ВПГ) и лейкоцитах крови (ВЭБ, ЦМВ), представляется резонным предположение об их «вытекании» из воспалительных и поврежденных клеток в десневую жидкость и в слюну. На эту тему была опубликована работа [7]. У больных с пародонтитами, гингивитами и у лиц без зубов собирали ротовую жидкость. Методом ПЦР в реальном времени в слюне определяли ЦМВ и ВЭБ. При этом ЦМВ был выявлен у 50% больных с пародонтитами, но не у пациентов с гингивитами или без зубов. Вирус Эпштейна–Барр в слюне был частой находкой во всех трех группах, включая лиц без собственных зубов (54% позитивных образцов). Авторы делают вывод, что источником ЦМВ в слюне могут быть очаги пародонтита.

Теоретически есть три варианта участия вирусных агентов в инфекционных процессах в полости рта [2, 3]: 1) прямое воздействие вируса с повреждением эпителия слизистой рта и тканей десен — характерен для эпителиотропных вирусов, прежде всего ВПГ; 2) усиление интенсивности бактериальной инфекции в результате вирус-индуцированной реакции подавления иммунной системы; 3) не исключено, что бактерии, в свою очередь, могут повысить вирулентность герпесвирусов, хотя прямых данных на эту тему пока не имеется.

Повышенная частота встречаемости герпесвирусов при пародонтитах показана во многих работах, начиная с 2000 года [8]. Это касается, прежде всего, вируса Эпштейна–Барр (табл. 1).

Как видно из таблицы 1, регулярное повышение при пародонтитах по сравнению с нормой отмечается для вируса Эпштейна–Барр, тогда как частота выявления цитомегаловируса существенно колеблется в различных выборках и в зависимости от типа патологии. Что касается вируса простого герпеса, то информации относительно его частоты пока недостаточно, чтобы судить о каких-либо клинико-лабораторных параллелях.

Частота выявления других вирусов при пародонтитах

Как известно, в организме человека существуют 2 основных типа вируса простого герпеса. В десневой

Таблица 1. Частота встречаемости герпесвирусов при патологии пародонта

| Заболевание | Биоматериал | Метод оценки | ВПГ | ВЭБ | ЦМВ | Примечания | Ссылка |
|------------------------|-------------------|--------------|---------------|--------------|---------------|-------------------------------|--------------------------------|
| Апикальный пародонтит | Пульпа | Гнездная ПЦР | – | 72% (50%) | 10% (0%) | Коррел. с повыш. мРНК ЭБВ | Hernadi et al., 2011 [10] |
| Апикальный пародонтит | Ротовая жидкость | Кач. ПЦР | 0% | 16–19% | 22–30% | Нет связи с лечением | Guilherme et al., 2011 [11] |
| Остр. апик. абсцесс | Экссудат | Кач. ПЦР | 4% | 0% | 0% | – | Ferreira et al., 2011 [12] |
| Периимплантит | п/д налет | Кач. ПЦР | – | 45% (11%) | 65% (6%) | – | Jancovic et al., 2011 [13] |
| Хронич. пародонтит | п/д налет | Гнездная ПЦР | – | 82,5% | 50% | Коррел. с глубиной кармана | Chalabi et al., 2010 [14] |
| Хронич. пародонтит | п/д налет | Мульг. ПЦР | 100% | 78,9% | 26,3% | Связь с возрастом и расой | Bilichodmath et al., 2009 [15] |
| Хронич. пародонтит | п/д налет | ПЦР кач. | – | 63,6% (30,3) | 79% (76%) | Коинфекция – в 52% | Wu et al., 2007 [16] |
| Хронич. пародонтит | п/д налет | Гнездная ПЦР | 40,0% (20,0%) | 46,7% (0,0%) | 50,0% (56,7%) | – | Imbronito et al., 2008 [17] |
| Агрессивный пародонтит | п/д налет | Гнездная ПЦР | 86,7% (20,0%) | 33,3% (0,0%) | 46,7 (56,7%) | – | Imbronito et al., 2008 [18] |
| Агрессивный пародонтит | Десневая жидкость | Колич. ПЦР | – | 57% (30%) | 6% (7%) | Сравнение с гингивитом | Watanabe et al., 2007 [19] |
| Агрессивный пародонтит | п/д налет | Кач. ПЦР | 0 | 3–25% (10%) | 0 | – | Nibali et al., 2009 [20] |
| Пародонтит неспец. | п/д налет | Кол. ПЦР | – | 28,2% (8,7%) | 0,3% | Нет связи с тяжестью | Dawson et al., 2009 [21] |
| Пародонтит неспец. | Десневая жидкость | Кач. ПЦР | – | – | 35% (8%) | Коррел. с утратой кост. ткани | Grenier et al., 2009 [22] |
| Пародонтит неспец. | Ротовая жидкость | Колич. ПЦР | – | 79% (33%) | 50% (0%) | Сравнение с гингивитом | Sahin et al., 2009 [7] |
| Пародонтит | Биоптаты десен | Гнездная ПЦР | – | 50,0% (7,7%) | 0% (7,8%) | – | Rotola et al., 2008 [23] |

жидкости больных с пародонтитом, согласно данным [9], преобладает ВПГ типа 1. С помощью метода ПЦР вирус типа 1 был выявлен у всех 26 больных, а ВПГ-2 – ни в одном образце.

Герпесвирус человека типа 6 исследовался в ряде работ. В слюне больных острыми апикальными абсцессами частота ВГЧ-6 составляла 5–15% [11].

В исследовании [10] ГВЧ-6 найден в 20% проб из пульпы зубов при апикальном пародонтите по сравнению с 2,5% в контроле. При этом среди генетических вариантов HHV-6 подтип В был достоверно ассоциирован с более крупными и клинически значимыми поражениями десен. Кроме того, в работе подтверждена значительная частота коинфекций разными герпесвирусами, особенно ГВ типа 6 с ВЭБ.

Встречаемость герпесвируса типа 8 (ГВЧ-8) в локальных пробах при острых апикальных абсцессах составляла 48% [12]. В ротовой жидкости при апикальных пародонтитах ГВЧ-8 был обнаружен в 84–88% случаев, вне зависимости от исхода лечения [11].

Папилломавирус

Папилломавирусы онкогенных подтипов (в особенности типов 16 и 18) достаточно часто ассоциированы с доброкачественными и злокачественными новообразованиями полости рта [24]. В то же время данные о связи папилломавируса с патологией пародонта очень скудны и противоречивы. Так, в одной из работ исследовали возможные общие механизмы папилломавирусной инфекции и пародонтитов как факторов возникновения

рака корня языка [25]. Папилломавирусы типов 16 и 18 определяли в препаратах опухолей и одновременно оценивали состояние пародонта у больных. ДНК ВПЧ-16 была найдена в 70% исследованных опухолей, тогда как ВПЧ-18 не был выявлен ни в одном образце. Интересно, что ВПЧ-позитивные больные имели значительно худшие показатели состояния пародонта. С учетом других факторов риска, было показано, что каждый миллиметр утраты костной основы десен ассоциирован с 4-кратным повышением риска носительства ВПЧ в опухоли. На основании этих косвенных данных, авторы полагают, что хронический пародонтит может быть существенным фактором ВПЧ-инфекции у больных с данным типом рака.

Что касается незлокачественных заболеваний ротовой полости, то в работе, проведенной в бразильском контингенте больных с хроническим пародонтитом и гингивитами и практически здоровых лиц [26], исследовали наличие в десневых тканях ВПЧ-16 с применением ПЦР в реальном режиме времени. В довольно большой группе обследованных (104 клинических образца) вирус папилломы типа 16 не был выявлен ни в одном случае, из чего был сделан вывод о том, что ВПЧ-16 может не участвовать в патогенезе хронического пародонтита, или, по крайней мере, ткань десен не является резервуаром данного вируса.

Другое исследование вирусной нагрузки проводилось у больных с острыми апикальными абсцессами [12], где в гнойном экссудате определяли ряд герпесвирусов, а также папилломавирус. При этом вирус папилломы был найден в 13% (3 из 23 случаев). Таким образом, представляется актуальной дальнейшая работа по выявлению онкогенных типов папилломавируса при патологии пародонта.

Состояние полости рта при ВИЧ-инфекции

В большом числе работ показано негативное воздействие ВИЧ-инфекции на состояние полости рта (например, см. обзор [27]). Среди ВИЧ-позитивных лиц около половины больных имеют клинические инфекции полости рта, связанные с патогенными грибами, бактериями или вирусами, являющиеся проявлением развивающегося иммунодефицита. Среди частых поражений полости рта, ассоциированных с ВИЧ-инфекцией, отмечают псевдомембранозный кандидоз, а также гингивит и пародонтиты. В целом эта тема, как и проблемы инфекций полости рта у других иммунокомпромированных больных (например, пациентов, перенесших трансплантацию костного мозга), заслуживает отдельного рассмотрения в будущем.

Влияние источника биоматериала и способа детекции вирусов

Чтобы изучить вопрос о виде биоматериала для выявления герпесвирусов при патологии пародонта, авторы

обследовали 40 больных с хроническим пародонтитом [17]. Частота ПЦР-позитивности по ВЭБ в поддесневых пробах, слюне и периферической крови была, соответственно, 45, 37,5 и 25%, тогда как цифры по ЦМВ были довольно близки (75–82%). Анализируя сравнительную чувствительность детекции вирусов по разному биоматериалу, авторы приходят к выводу, что определение ВЭБ требует одновременного анализа ротовой жидкости и поддесневых проб, чтобы избежать ложноотрицательных результатов.

В связи с разнообразием методик определения герпесвирусов проводилось сравнительное исследование ЦМВ в образцах десневой жидкости от 44 больных пародонтитом и 24 контрольных лиц с использованием методики гнездовой ПЦР, а также ПЦР в реальном времени, по сравнению со стандартным культуральным методом [28]. Оказалось, что наиболее чувствительным методом была гнездовая ПЦР (два последовательных процесса амплификации целевого гена), менее чувствительной — методика ПЦР в реальном времени, тогда как клеточная культура была почти неэффективна для выявления ЦМВ в десневых образцах. Таким образом, ПЦР-диагностика представляется наиболее пригодной для выявления вирусов герпесгруппы в данном биоматериале.

Состояние полости рта при ВИЧ-инфекции

В большом числе работ показано негативное воздействие ВИЧ-инфекции на состояние полости рта (см. обзор [27]). Среди ВИЧ-позитивных лиц около половины имеют клинические инфекции полости рта, связанные с патогенными грибами, бактериями или вирусами, являющиеся проявлением развивающегося иммунодефицита.

Заключение

Результаты многочисленных исследований, проведенных в разных странах, показывают, что при различных клинических формах пародонтита может возрастать встречаемость герпесвирусов, в частности ВЭБ и ЦМВ. В ряде исследований показано, что эти вирусы чаще обнаруживаются в пробах с пораженных десен по сравнению с непораженными зонами. Однако эта взаимосвязь еще не означает значимого влияния на развитие и клиническое течение пародонтита, поскольку, по данным количественной ПЦР, эти вирусы выявляются не у всех больных и иногда в очень небольших количествах.

В то же время необходимо учитывать эпидемиологическое значение вирусной инфекции ротовой полости, так как при этих состояниях становится возможным ее перенос от человека к человеку. В особенности это касается ЦМВ-инфекции, поскольку локальное размножение вируса сопровождается его выделением в слюну и существенным риском инфекции для других лиц.

Установление роли различных вирусов в развитии и модификации бактериальной инфекции, безусловно, поможет в уточнении патогенеза пародонтитов, а также создаст основу для разработки новых подходов к профилактике и своевременному лечению инфекционных заболеваний пародонта.

Литература

1. Grinde B., Olsen I. The role of viruses in oral disease. *J. Oral Microbiol.* 2010; 2: 2127 — DOI: 10.3402/jom.v2i0.2127.
2. Slots J. Update on human cytomegalovirus in destructive periodontal disease. *Oral Microbiol. Immunol.* 2004; 19: 217–223.
3. Slots J. Herpesvirus periodontitis: infection beyond biofilm. *J. Calif. Dent. Assoc.* 2011; 39 (6): 393–399.
4. Michalowicz B.S., Ronderos M., Camara-Silva R., Contreras A., Slots J. Human herpesviruses and *Porphyromonas gingivalis* are associated with juvenile periodontitis. *J. Periodontol.* 2000; 71 (6): 981–988.
5. Saygun I., Kubar A., Sahin S., Sener K., Slots J. Quantitative analysis of association between herpesviruses and bacterial pathogens in periodontitis. *J. Periodontol. Res.* 2008; 43 (3): 352–359.
6. Slots J. Herpesviruses, the missing link between gingivitis and periodontitis? *J. Int. Acad. Periodontol.* 2004; 6 (4): 113–119.
7. Sahin S., Saygun I., Kubar A., Slots J. Periodontitis lesions are the main source of salivary cytomegalovirus. *Oral Microbiol. Immunol.* 2009; 24 (4): 340–342.
8. Slots J. Oral viral infections of adults. *Periodontol.* 2000; 49: 60–86.
9. Contreras A., Slots J. Typing of herpes simplex virus from human periodontium. *Oral Microbiol. Immunol.* 2001; 16 (1): 63–64.
10. Hernádi K., Csoma E., Adám B., Szalmás A., Gyöngyösi E., Veress G., Ildikó-Márton, Kónya J. Association of human herpesvirus 6 subtypes with symptomatic apical periodontitis. *Oral Surg. Oral. Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 2011; 112 (3): 401–406.
11. Guilherme B.P., Ferreira D.C., Rôças I.N., Provenzano J.C., Santos K.R., Siqueira J.F. Jr. Herpesvirus carriage in saliva and posttreatment apical periodontitis: Searching for association. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 2011, Aug 9.
12. Ferreira D.C., Paiva S.S., Carmo F.L., Rôças I.N., Rosado A.S., Santos K.R., Siqueira J.F. Jr. Identification of herpesviruses types 1 to 8 and human papillomavirus in acute apical abscesses. *J. Endod.* 2011; 37 (1): 10–16.
13. Jankovic S., Aleksic Z., Dimitrijevic B., Lekovic V., Camargo P., Kenney B. Prevalence of human cytomegalovirus and Epstein–Barr virus in subgingival plaque at peri-implantitis, mucositis and healthy sites. A pilot study. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2011; 40 (3): 271–276.
14. Chalabi M., Rezaei F., Moghim S., Mogharehabet A., Rezaei M., Mehraban B. Periodontopathic bacteria and herpesviruses in chronic periodontitis. *Mol. Oral Microbiol.* 2010; 25 (3): 236–240.
15. Bilichodmath S., Mangalekar S.B., Sharma D.C., Prabhakar A.K., Reddy S.B., Kalburgi N.B., Patil S.R., Bhat K. Herpesviruses in chronic and aggressive periodontitis patients in an Indian population. *J. Oral Sci.* 2009; 51 (1): 79–86.
16. Wu Y.M., Yan J., Ojcius D.M., Chen L.L., Gu Z.Y., Pan J.P. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45 (11): 3665–3670.
17. Imbrunito A.V., Okuda O.S., Maria de Freitas N., Moreira Lotufo R.F., Nunes F.D. Detection of herpesviruses and periodontal pathogens in subgingival plaque of patients with chronic periodontitis, generalized aggressive periodontitis, or gingivitis. *J. Periodontol.* 2008; 79 (12): 2313–2321.
18. Imbrunito A.V., Grande S.R., Freitas N.M., Okuda O., Lotufo R.F., Nunes F.D. Detection of Epstein–Barr virus and human cytomegalovirus in blood and oral samples: comparison of three sampling methods. *J. Oral Sci.* 2008; 50 (1): 25–31.
19. Watanabe S.A., Correia-Silva J.de F., Horta M.C., Costa J.E., Gomez R.S. EBV-1 and HCMV in aggressive periodontitis in Brazilian patients. *Braz. Oral Res.* 2007; 21 (4): 336–341.
20. Nibali L., Atkinson C., Griffiths P., Darbar U., Rakmanee T., Suvan J., Donos N. Low prevalence of subgingival viruses in periodontitis patients. *J. Clin. Periodontol.* 2009; 36 (11): 928–932.
21. Dawson D.R. 3rd, Wang C., Danaher R.J., Lin Y., Kryscio R.J., Jacob R.J., Miller C.S. Salivary levels of Epstein–Barr virus DNA correlate with subgingival levels, not severity of periodontitis. *Oral Dis.* 2009; 15 (8): 554–559.
22. Grenier G., Gagnon G., Grenier D. Detection of herpetic viruses in gingival crevicular fluid of patients suffering from periodontal diseases: prevalence and effect of treatment. *Oral Microbiol. Immunol.* 2009; 24 (6): 506–509.
23. Rotola A., Cassai E., Farina R., Caselli E., Gentili V., Lazzarotto T., Trombelli L. Human herpesvirus 7, Epstein–Barr virus and human cytomegalovirus in periodontal tissues of periodontally diseased and healthy subjects. *J. Clin. Periodontol.* 2008; 35 (10): 831–837.
24. Ha P.K., Califano J.A. The role of human papillomavirus in oral carcinogenesis. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 2004; 15 (4): 188–196.
25. Tezal M., Sullivan Nasca M., Stoler D.L., Melendy T., Hyland A., Smaldino P.J., Rigual N.R., Loree T.R. Chronic periodontitis-human papillomavirus synergy in base of tongue cancers. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2009; 135 (4): 391–396.
26. Horewicz V.V., Feres M., Rapp G.E., Yasuda V., Cury P.R. Human papillomavirus-16 prevalence in gingival tissue and its association with periodontal destruction: a case-control study. *J. Periodontol.* 2010; 81 (4): 562–568.
27. Petersen P.E., Bourgeois D., Ogawa H., Estupinan-Day S., Ndiaye C. The global burden of oral diseases and risks to oral health. *Bull. WHO.* 2005; 83: 661–669.
28. Botero J.E., Vidal C., Contreras A., Parra B. Comparison of nested polymerase chain reaction (PCR), real-time PCR and viral culture for the detection of cytomegalovirus in subgingival samples. *Oral Microbiol. Immunol.* 2008; 23 (3): 239–244.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ IgE И IgG-АНТИТЕЛ ПРИ АЛЛЕРГИИ К МЕСТНЫМ АНЕСТЕТИКАМ И ПРОТЕЗНЫМ МАТЕРИАЛАМ. КАКОВО ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ?

А.А. ЛАЗАРЕНКО

ГБОУ ВПО СПбГМУ им. И.П. Павлова Минздравсоцразвития России

Резюме. Цель нашего исследования: оценить диагностическую значимость определения Ig-E и IgG-антител при аллергии к местным анестетикам и протезным материалам. Обследовано 55 пациентов с указанием на непереносимость местных анестетиков (группа А) и 317 пациентов с симптомами непереносимости протезных материалов (группа Б).

Результаты: положительные уровни IgE-антител были обнаружены у 14,8% больных в группе А. В группе Б (при аллергии на протезные материалы) IgE-специфические антитела были положительными на акрил в 17,4% случаев. При исследовании аллергии к металлам процент положительных IgE-антител был следующим: к никелю — у 33,3%, кобальту — 31,8%, хрому — 28,3%, платине — 27,3%, меди — 25,4%, золоту — 23,1%, палладию — 21,2% пациентов. IgG-антитела к анестетикам в группе А обнаружены у 1–2,4% пациентов (мепивакаин — 1,8%, артикаин — 2,4%, лидокаин — 4%, прилокаин — 1%). В группе Б процент положительных IgG-антител был следующим: к никелю — у 21,8%, кобальту — 21,7%, хрому — 20,3%, платине — 20,7%, меди — 13,4%, золоту — 33,1%, палладию — 4,9% пациентов.

Совпадение положительных проб по классам IgE и IgG не всегда было однозначным. Наш опыт позволяет заключить, что определение IgG-антител при аллергии к местным анестетикам и протезным материалам является вспомогательным инструментом диагностики и должно интерпретироваться совместно с данными определения IgE-антител.

Ключевые слова: аллергия, гиперчувствительность, диагностика *in vivo*, диагностика *in vitro*, иммуноглобулин E, иммуноглобулин G, местные анестетики, протезные материалы.

DETECTION OF IgE AND IgG-ANTIBODIES TO LOCAL ANAESTHETICS AND DENTAL MATERIALS. WHAT IS THE DIAGNOSTIC VALUE?

L.L. LAZARENKO

State budget educational Institution of Higher professional education

“Saint-Petersburg State Pavlov Medical University”, Ministry of Health Care and Social Development

Summary. The aim of the study was to evaluate the diagnostic role of IgE and IgG-antibodies in patients with local anesthetics allergy and prosthetic materials allergy. The experimental group included 55 patients with local anesthetics intolerance (group A) and 317 ones with prosthetic materials intolerance (group B).

IgE elevation was detected in 14,8% of group A patients. In group B specific IgE were detected in following number of patients: to nickel — 33,3%, cobalt — 31,8%, chrom — 28,3%, platinum — 27,3%, copper — 25,4%, gold — 23,1%, palladium — 21,2%. IgG-antibodies were found in 1–2,4% of A group. In B group the number of patients was following: nickel — 21,8%, cobalt — 21,7%, chrom — 20,3%, platinum — 20,7%, copper — 13,4%, gold — 33,1%, palladium — 4,9%.

So, not in all the cases positive results of IgE and IgG tests coincided. The results can suggest, that IgG antibodies evaluation can be the additional diagnostic method which can be interpreted only in presence of specific IgE levels.

Key words: allergy, hypersensitivity, diagnostic procedures *in vivo*, diagnostic procedures *in vitro*, immunoglobulin E, immunoglobulin G, local anaesthetics, dental materials.

Данные для корреспонденции:

Лазаренко Людмила Леонидовна, к. м. н., старший научный сотрудник лаборатории диагностики аутоиммунных заболеваний Научно-методического центра по молекулярной медицине СПбГМУ им. И.П. Павлова; тел.: (812) 499-71-94, e-mail: lazarenko@list.ru

В настоящее время наблюдается устойчивый рост аллергических заболеваний, в том числе в стоматологической практике. На возросшую непереносимость

стоматологических материалов указывают К.А. Лебедев и соавт. [1]. Авторы сообщают, что в лабораторию клинической иммунологии Московского государственного

медицинского стоматологического университета с проблемами непереносимости лекарств и материалов за последние 15 лет обратилось 8,5 тысяч пациентов, при этом процент алергонепереносимости увеличился с 6 до 20%. Согласно данным городского организационно-методического отдела по стоматологии Комитета по здравоохранению правительства Санкт-Петербурга (зав. В.А. Григорьев) посещения врачей-аллергологов в стоматологических поликлиниках возросли на 15% и в 2010 году составили 3947 посещений в год, в том числе первичные больные составили 1494 человека. Существенной проблемой является необходимость переделки протезных конструкций из-за развития аллергических реакций. В 2010 году таких случаев в Санкт-Петербурге было зарегистрировано 69, что в среднем нанесло ущерб поликлиникам в размере 2 млн рублей.

Своеобразную «эпидемию» аллергии можно объяснить так называемой «гигиенической гипотезой» [2]. Суть ее сводится к тому, что в развитых странах население мало контактирует с различными микроорганизмами, и это приводит к неполноценному функционированию иммунной системы, девиации иммунного ответа в сторону Th2 типа (активации IgE-зависимых реакций), а также недостаточности системы образ-распознающих рецепторов, что ведет к срыву иммунологической (в том числе оральной) толерантности. Эти сдвиги в иммунной системе ведут к патологической реакции на уровне как врожденного, так и адаптивного иммунитета — по Т-клеточному и IgE-антительному типам. Именно эти реакции обуславливают случаи аллергии на местные анестетики и протезные материалы [1].

Как известно, в основе непереносимости лекарств и других гаптенов (например, металлов) лежат как иммунные, так и не иммунные механизмы.

Побочные действия лекарственных средств подразделяют на две большие группы. Реакции типа А обычно предсказуемы и напоминают фармакологическое действие лекарства: например, сонливость от антигистаминных препаратов I поколения. Реакции типа Б непредсказуемы и включают как идиосинкразию, обусловленную индивидуальной предрасположенностью организма (некие дефекты ферментной системы), так и реакции гиперчувствительности, т. е. аллергию [3].

Аллергию определяют как необычную реакцию организма в ответ на повторное введение антигена (аллергена), в основе которой лежат иммунные механизмы. Согласно классификации Gell и Coombs [4], различают несколько типов аллергических реакций.

I тип аллергических реакций на лекарства, или так называемый немедленный тип аллергических реакций, опосредуется IgE-антителами и обычно вызывает крапивницу, анафилаксию и бронхоспазм. Симптомы, как правило, возникают в течение часа после назначения лекарства.

Менее типичные реакции II типа основываются на иммуноглобулин-G-опосредованных цитотоксических

механизмах, где мишенью аллергической реакции служит клеточная мембрана (различные цитопении).

III тип аллергических реакций опосредуется иммунными комплексами и встречается, например, при васкулитах.

Наконец, IV тип аллергических реакций известен как гиперчувствительность замедленного типа, которая опосредуется сенсibilизированными лекарствами (или гаптенами) Т-лимфоцитами [5]. Для всех типов гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) требуется присутствие Т-клеток. Т-клетки, с одной стороны, инфильтрируют ткани и вызывают органические поражения [6], с другой стороны, продуцируют цитокины, которые способствуют переключению антительного ответа [7]. Существующие реакции ГЗТ подразделяются на 4 типа реакций: IVa–IVd.

Тип IVa соотносят с Th1-иммунными реакциями, Т-клетки этого типа активируют макрофаги путем секреции интерферона-гамма, усиливают продукцию компонента и выступают как стимуляторы провоспалительного цитотоксического ответа. Клинический пример — кожные тесты на туберкулин и аллергический контактный дерматит.

Тип IVb соотносят с Th2 типом иммунного ответа. Th2 клетки секретируют ИЛ-4, ИЛ-13 и ИЛ-5 цитокины, которые способствуют продукции В-клетками IgE и IgG4-антител. Повышенная продукция ИЛ-5 опосредует эозинофильное воспаление, которое характеризует большинство реакций гиперчувствительности (астма, ринит, крапивница) [8].

Тип IVc реакции. В этом случае Т-клетки выступают как эффекторные клетки. Они эмигрируют в ткани и атакуют их с помощью перфорина или гранзима [9]. К ним относят наиболее распространенные реакции на лекарства (макуло-папулезные сыпи или буллезные дерматиты, включая синдром Стивенса–Джонсона и токсический эпидермальный некролиз).

Тип IVd. В этом случае Т-клетки, активируемые антигеном, вызывают нейтрофильное воспаление, в том числе стерильное. Типичным примером может служить стерильное нейтрофильное воспаление при генерализованном экзематозном пустулезе. В этом случае Т-клетки рекрутируют нейтрофильные лейкоциты и предотвращают их апоптоз через высвобождение GM-CSF [10].

В настоящее время в дополнение к известной классификации Gell и Coombs выделяют еще и V тип аллергических реакций — антирецепторный. В патогенезе не иммунных (псевдоаллергических) реакций лежит прямое высвобождение биологически активных веществ, т. е. медиаторов аллергии (гистамина, лейкотриенов, простагландинов и др.) из эффекторных клеток — базофилов, эозинофилов. Однако современное представление о развитии псевдоаллергических реакций состоит в том, что они возникают в результате специфической стимуляции алергеном системы сигнальных образ-распозна-

ющих рецепторов (ОРР) [11]. Открытие в конце прошлого века Карлом Дженувеем системы образраспознающих рецепторов отвергло догму, согласно которой к специфическому распознаванию антигена способны лишь Т-клетки. Как оказалось, на всех клетках иммунной системы как врожденного, так и адаптивного иммунитета имеются ОРР, большинство из которых представлены сигнальными ОРР (сОРР). В настоящее время известно пять семейств сОРР, среди них более изучены Toll-like рецепторы (ТПР) [12]. Ранее считалось, что лигандами для сОРР служат лишь микроорганизмы, в то время как доказано, что низко молекулярные аллергены и металлы также являются специфическими лигандами для тех или иных типов сОРР [13]. В частности, ТПР, находящиеся на базофилах и тучных клетках, активируют продукцию этими клетками различных цитокинов. Некоторые из них (например, Rantes), способны активировать дегрануляцию этих клеток, что приводит к развитию аллергического воспаления [14].

Таким образом, главным патогенетическим механизмом аллергической реакции является измененная иммунная реактивность, которая выражается в гиперпродукции специфических антител, чаще IgE, реже IgG4, специфически сенсibilизированных Т-лимфоцитов, провоспалительных цитокинов и других медиаторов, как преформированных (гистамин, триптаза, гепарин, химаза, хемоаттрактанты), так и вторичных (цистениловые лейкотриены, простагландины, тромбоксаны, фактор, активирующий тромбоциты, брадикины).

Аллергическая реакция на местные анестетики и протезные материалы, как и любая аллергическая реакция, характеризуется развитием повышенной реакции иммунной системы на молекулы данного вещества, которые служат неполными антигенами, т. е. гаптенами. Догмой в иммунологии является тот факт, что молекулы массой менее 1000 дальтон не могут быть полными антигенами *per se*. Таким образом, распознавание Т- и В-лимфоцитами небольших молекул, какими являются лекарства и металлы, объясняют гаптенной гипотезой [3, 5], согласно которой гаптены становятся полными антигенами, ковалентно связываясь с большими протеинами или пептидами (растворимый протеин-альбумин сыворотки, клеточно-связанный интегрин, или пептиды главного комплекса гистосовместимости). Исключением в этом случае является никель, который является главной причиной контактного дерматита. Никель стимулирует Т-клетки иммунной системы особым образом: он формирует комплекс с двумя участками молекулы главного комплекса гистосовместимости и двумя фрагментами Т-клеточного рецептора [15]. Химические гаптены имеют свойство связывать различные аминокислоты в пределах протеина. Соответственно формируются новые модифицированные антигенные детерминанты, которые вызывают различные варианты иммунного ответа. Этим обеспечивается широкий спектр клинических проявлений, основанных на образовании

как IgE, так и IgG-антител, направленных как на растворимые, так и клеточно связанные протеины.

Помимо иммунных реакций, некоторые лекарства или металлы могут вызывать токсический или раздражительный эффекты, которые инициируют некоторые воспалительные реакции. Эти токсические эффекты могут быть опосредованы дополнительным связыванием белков или аминокислот, формируя так называемые «сигналы опасности». Большинство антиген-презентирующих клеток (дендритные клетки) могут быть активированы подобными сигналами. Иногда гаптены могут непосредственно активировать дендритные клетки, ковалентно связывая их внутренние или поверхностные клеточные структуры [16].

Многие анестетики и металлы, являясь химически инертными, все же могут вызывать иммунно-опосредованные побочные эффекты. Это находит объяснение в прогаптенной гипотезе, которая соотносится с гаптенной гипотезой. При этом постулируется, что инертное лекарство (металл) становится иммуногенным в процессе метаболизма [3, 5, 17]. Эти побочные эффекты могут опосредоваться как IgE-и IgG-антителами, так и Т-клетками. Подобные реакции вызывают различные типы аллергических болезней, вовлекая многие органы и системы (экзантемы, анафилаксию, синдром Стивенса–Джонсона, гепатиты) [6].

Недавно была предложена новая, третья, так называемая р-і гипотеза, объясняющая механизм распознавания иммунной системой лекарств и других гаптенных (в английской аббревиатуре — *pharmacological interaction of drugs with immune system*, в буквальном переводе с английского — фармакологическое взаимодействие лекарств с иммунной системой). Ее авторы — Zanni (1998) [7] и Pichler (2003) [5] — полагают, что инертные лекарства (металлы), не способные ковалентно связывать пептиды или протеины, тем не менее, непосредственно активируют особый вид рецепторов Т-клеток: высоко полиморфные альфа-бета-рецепторы Т-клеток, стимулируя тем самым некоторые клетки адаптивной иммунной системы через их поверхностные рецепторы для антигенов.

Каждый клиницист-стоматолог должен быть знаком с различными механизмами аллергических реакций на анестетики и протезные материалы, поскольку эти реакции могут привести к летальному исходу. В случае IgE- и IgG4-зависимых реакций высвобождение медиаторов из тучных клеток может привести к анафилактическому шоку, а через активацию Т-клеток — к тяжелым буллезным дерматитам и декомпенсированному поражению внутренних органов.

Диагностика непереносимости лекарств и протезных материалов в практике врача до сих пор является сложной и противоречивой проблемой. Прежде всего, необходимо ответить на три вопроса: является ли эта реакция аллергической, какой механизм может быть вовлечен и какое лекарство (материал) ее вызвало?

Обратимся, прежде всего, к клинической картине. Чаще всего при аллергии поражаются кожа и слизистые оболочки. В этом случае дифференциальный диагноз нужно проводить с вирусными экзантемами, либо с другими инфекциями, пищевой аллергией, реакцией «трансплантат против хозяина». Сильный зуд, эозинофилия, сам факт развития симптомов после назначения нового лекарства (анестетика) или применения материала для протезирования чаще свидетельствует в пользу аллергической реакции. Необходимо обратить внимание на вовлечение в реакцию лимфоузлов, изменения со стороны внутренних органов, боль и лихорадку, а также данные биохимических исследований: С-реактивного белка, АЛТ, АСТ, ГГТ. Лабораторные исследования помогут определить тяжесть аллергической реакции. Важным является определение триптазы, причем оптимальный уровень забора биологического материала для этого анализа — 2–4 часа после реакции, чтобы подтвердить вовлечение медиаторов тучных клеток. При немедленно-замедленных реакциях, где предполагается участие эозинофилов, полезно определение эозинофильного катионного белка. Характерна связь клинических симптомов со временем их развития [18]. Так, немедленное развитие симптомов более характерно для IgE-зависимых реакций или псевдоаллергических реакций, обусловленных высвобождением медиаторов из тучных клеток. Обычно эти симптомы возникают в течение часа после поступления аллергена и сопровождаются крапивницей, ангиоотекотом (отеком Квинке) и анафилаксий. Замедленные реакции развиваются не ранее чем через 6–12 часов после поступления аллергена и в большинстве являются не IgE-опосредованными. Они представлены Т-клеточным воспалением или IgG-опосредованными реакциями.

Существуют особенности клинических проявлений аллергических реакций, характерных как для местных анестетиков, так и для протезных материалов. Достаточно часто больным с любыми проявлениями побочных реакций, связанных с применением местноанестезирующих средств, стоматологи или врачи других специальностей рекомендуют исключение всех «-каинов», назначая потенциально более опасный общий наркоз. В то же время большинство побочных эффектов при использовании местных анестетиков связано с вегетативно-сосудистыми расстройствами, токсическими и истерическими реакциями, а также побочным действием входящих в состав многих современных местноанестезирующих средств эpineфрина (адреналина). Чаще всего аллергические реакции на местные анестетики проявляются в виде контактного дерматита, реакции немедленного типа встречаются гораздо реже [19].

Как известно, местноанестезирующие средства подразделяют на две большие группы: производные эфиров бензойной кислоты (группа 1) и амиды (группа 2).

Группа 1. Эфиры бензойной кислоты

- Бензокаин (анестезин);

- Прокаин (новокаин);
- Кокаин;
- Пропаракаин;
- Тетракаин (дикаин).

Группа 2. Амиды

- Бупивакаин (анекаин, маркаин);
- Лидокаин (ксикаин);
- Мепивакаин (изокаин, скадонест);
- Ультракаин (артикаин).

Эфиры бензойной кислоты вызывают перекрестные аллергические реакции внутри первой группы, но не к препаратам второй группы. Внутри препаратов второй группы, как правило, не существует перекрестной сенсибилизации. В антигенном отношении они менее опасны. Иногда встречаются псевдоаллергические реакции, обусловленные наличием добавок (парабены, сульфиты), входящих в состав местных анестетиков в качестве консервантов [20]. Все чаще случаются случаи латексной аллергии при использовании материалов, содержащих каучук (перчатки, резиновые прокладки). Латекс — естественный млечный каучуковый сок, получаемый с каучуконосного дерева *Hevea brasiliensis*. В процессе переработки к аммонизированному каучуку добавляют различные катализаторы, антиоксиданты, консерванты. Естественные аллергены каучука — белки, присутствующие в сыром латексе [21]. При контакте с кожей они выселачиваются и, адсорбируясь на частицах кукурузного крахмала, которым обычно припудривают перчатки, способны вызвать реакции как немедленного типа (анафилактический шок, бронхиальную астму, ринит, крапивницу, ангиоотек), так и реакции гиперчувствительности замедленного типа в виде аллергического контактного дерматита [22]. Вот почему во время проведения локальной анестезии в случае развившейся аллергической реакции, реакцию на местный анестетик нужно дифференцировать с латексной аллергией. Собирая анамнез, следует обратить внимание на фруктово-латексный синдром, при котором пациенты указывают на непереносимость некоторых фруктов, которые имеют общие антигенные детерминанты с латексом (бананы, авокадо, киви, плоды страстоцвета и каштана, цитрусовые, гуава, персики, земляника, папайя, слива, вишня, а также овощи — помидоры, картофель). Это обстоятельство заранее позволит заподозрить аллергию на латекс.

Клинические проявления непереносимости протезных материалов, с одной стороны, разнообразны, но с другой стороны, однотипны при разных причинах, их вызывающих [1].

На основании тех или иных клинических симптомов пациенту часто ставят диагнозы стоматита, хейлита, глоссита, гингивита и др. Отсутствие эффекта от лечения соответствующих заболеваний позволит заподозрить наличие непереносимости протезных материалов. У части пациентов присутствуют общеклинические нарушения: симптомы со стороны желудочно-кишечного

Таблица 1. Клинические проявления непереносимости стоматологических материалов в полости рта.
 Цит. по [1]

| Группа критериев | Субъективные проявления | Объективные проявления |
|--|--|---|
| Жжение (горячий рот) | Жжение языка Пощипывание, покалывание языка Чувство ожога языка, слизистой оболочки Чувство «батарейки» | |
| Изменения вкусовых ощущений | Кислый, горький, соленый или другой вкус Металлический вкус Дисгевзия (извращенный вкус) Неприятный вкус | |
| Изменения выделения и свойств слюны | Ксеростомия (сухость во рту) Ощущение изменения качества слюны (вязкая, густая, белая, пенистая) Повышенное слюноотделение | Гипосаливация Гиперсаливация |
| Поражение слизистой оболочки рта и языка | Боль, зуд | Гиперемия Отек Трещины Афты Эрозии, язвы Лихеноидные поражения |

тракта (боли в области желудка, печени, поджелудочной железы), заболеваний дыхательной системы (першение в горле, изменение голоса, кашель, затрудненность дыхания, бронхоспазм), нарушения со стороны нервной системы (нарушение сна и сонливость, раздражительность, головные боли, головокружения). Однако подобные симптомы обязательно сочетаются с местными симптомами и купируются после удаления протезных материалов (элиминации аллергена) [23].

При поиске «виновного» аллергена анамнез является определяющим. Очень часто эпизод лекарственной аллергии несет в себе множество различных патогенетических механизмов. Понятно, что один тест может выявить какой-то единичный механизм, поэтому отрицательный результат не может отвергнуть лекарственную гиперчувствительность.

Важно ответить на следующие вопросы:

- Какое лекарство было принято и когда?
- Была ли превышена доза?
- Принимались ли одновременно другие препараты и могли ли они повлиять на метаболизм подозреваемого лекарства (материала для протезирования)?
- Как анестетик (материал) переносился ранее?
- Какое было сопутствующее заболевание?
- Случались ли подобные реакции ранее?

Во многих случаях анамнез и ответы на эти вопросы позволяют определиться с аллергеном, но так бывает далеко не всегда.

В этих случаях необходимы дальнейшие шаги. Среди методов диагностики можно выделить две группы: тесты, выполняемые на самом пациенте (тесты *in vivo*)

и пробы *in vitro* (лабораторные методы). И те, и другие в случаях лекарственной аллергии весьма сложны в стандартизации и воспроизведении. Тесты *in vivo* опасны для организма, так как аллергия может развиваться от минимального количества лекарства. Для тестов *in vitro* часто требуется отнюдь не сыворотка, а гепаринизированная кровь, что затрудняет доставку в лабораторию. Важно соблюдать три главных правила:

1. Тесты сами по себе лишь дополняют анамнез.
2. Чувствительность большинства тестов не очень велика, поэтому в большей степени для интерпретации важен положительный ответ, нежели отрицательный, так как последний не может полностью отвергнуть факт наличия аллергии у пациента.
3. Комбинация различных тестов может увеличить чувствительность.

Тесты *in vivo*

Для подтверждения аллергических реакций на лекарства используют кожные тесты и дозируемый провокационный тест (осторожное повторное введение подозреваемого препарата). Проведение последнего весьма ограничено. Кожные пробы — это диагностический метод выявления сенсibilизации организма путем введения через кожу аллергена и оценки величины и характера развившихся при этом отека или воспалительной реакции. Кожное тестирование является наиболее распространенным, простым по технике выполнения и достаточно специфичным методом аллергодиагностики. Существует несколько технических модификаций кожного тестирования: скарификационные

пробы, пробы уколом (прик-тест), внутрикожные пробы, аппликационные (эпикутанные, патч-тесты) пробы. Выбор метода кожного тестирования зависит от вида заболевания, предполагаемого типа аллергической реакции, предполагаемой групповой специфичности аллергена [24].

Показанием для проведения кожных тестов являются данные анамнеза, указывающие на причинную роль того или иного аллергена в развитии аллергической реакции. В случае лекарственной аллергии проведение всех тестов *in vivo* возможно только по строгим показаниям.

Существуют общие противопоказания для кожного тестирования:

1. Обострение основного заболевания.
2. Острые интеркуррентные инфекции.
3. Тяжелое течение бронхиальной астмы.
4. Обострение очагов хронической инфекции, активная фаза хронических инфекционных заболеваний (туберкулез, сифилис, бруцеллез и др.).
5. Декомпенсированные заболевания внутренних органов (печени, почек, сердечно-сосудистой и эндокринной систем, крови и др.).
6. Аутоиммунные болезни (системная красная волчанка, склеродермия, ревматоидный артрит, дерматомиозит и др.).
7. Злокачественные новообразования.
8. Психические заболевания.
9. Беременность и лактация.
10. Синдром приобретенного иммунодефицита.

Для диагностики гиперчувствительности немедленного типа используют скарификационные тесты, прик-тесты и внутрикожные тесты. Как правило, кожные тесты проводят только со стандартными лекарственными аллергенами для выявления IgE-зависимых реакций. Эти кожные пробы позволяют выявить у больного риск развития анафилактических реакций. Теоретически возможно, что лекарство может связаться на месте его нанесения на коже с IgE-антителами, фиксированными в дерме, что приведет к высвобождению медиаторов и положительной кожной пробе. Наиболее достоверные результаты получаются при использовании коммерческих аллергенов для кожного тестирования. В этих тестах лекарственный аллерген, как правило, конъюгирован с крупномолекулярным носителем (например, полилизинном), формируя детерминанты, способные к перекрестному связыванию рецепторов к IgE (FcεR). Чувствительность подобных тестов велика — от 95 до 70% [25]. К сожалению, такие коммерческие тест-системы разработаны лишь для бета-лактамов антибиотиков. Существует обширная литература по технике проведения кожных тестов и их концентраций [26]. Прик-тесты, скарификационные тесты (которые до сих пор выполняются в нашей стране) и внутрикожные пробы оцениваются через 15–20 минут. Внутрикожные тесты иногда оцениваются через 24 часа,

и повторно через 48 часов, чтобы оценить замедленные реакции.

Следует подчеркнуть, что юридическое право проводить тесты с лекарственными аллергенами имеет лишь врач-аллерголог при наличии соответствующей подготовки в условиях аллергологического кабинета (станции), оборудованного средствами для оказания помощи при анафилаксии.

В случае аллергии на местные анестетики тактика ведения больных следующая:

1. Необходимо получить от больного информированное согласие на проведение тестов *in vivo*.
2. Определить для подбора местный анестетик. К примеру, если ранее наблюдалась реакция на эфиры бензойной кислоты, следует выбрать анестетик из группы амидов. Если реакцию вызвало местноанестезирующее вещество амидной структуры, то выбирают другой препарат из этой группы. Важно, чтобы тестируемый анестетик не содержал эpineфрин (адреналин)!
3. Выдерживая 15-минутные интервалы:
 - Провести кожную пробу (прик-тест), используя неразведенный местный анестетик.
 - При отсутствии реакции ввести подкожно в область предплечья 0,1 мл местного анестетика в разведении 1:100.
 - При отсутствии местной реакции ввести подкожно 0,1 мл местного анестетика в разведении 1:10.
 - При отсутствии местной реакции ввести 1 мл, а затем 2 мл неразведенного местного анестетика.
4. После проведения процедуры выдать справку больному о том, что он получил 3 мл соответствующего местного анестетика без каких-либо побочных реакций [27].

Успех такого подхода связан, прежде всего, с низкой частотой истинных аллергических реакций на местные анестетики. Вместе с тем, такая схема позволяет снять беспокойство врачей и пациентов, а также выявить лиц из группы риска по возникновению аллергической реакции, обусловленной IgE, на введение местного анестетика. Однако отрицательный результат кожного теста эту возможность не исключает [28].

Аппликационные тесты (патч-тесты) используют при аллергических реакциях замедленного типа при возникновении аллергического контактного дерматита, макулопапулезных сыпях и других кожных нежелательных реакциях на лекарственные средства [29]. Преимуществом аппликационных тестов является возможность выполнения их с любой коммерческой формой лекарства или материала, в то время как для внутрикожных тестов требуются только стерильные растворы. Кроме того, аппликационные тесты относительно безопасны, в связи с чем для их постановки госпитализация пациента не требуется. В образцах биопсии, полученных при положительных аппликационных тестах, находят повы-

шенную экспрессию молекул адгезии ICAM-1 (CD54) на кератиноцитах или ELAM-1 на эндотелиальных клетках. Т-клетки (CD4) продуцируют ИЛ-8, который, будучи хемоаттрактантом, привлекает нейтрофилы, вызывая воспаление [30].

В стоматологической практике аппликационные тесты используют чаще для исследования аллерго-непереносимости протезных материалов. Указывают на возможность проведения не только эпикутанного, но и интрамукозального (интраорального) осуществления патч-тестов, но накожные тесты просты в исполнении, поэтому чаще распространены [31]. Обычно аппликационные тесты выполняют на волярной поверхности предплечья, спине или животе. После обезжиривания кожи спиртом на поверхность кожи накладывают пористый носитель (марлю, губку, гель) площадью 1 см, содержащий раствор аллергена в определенном носителе (вазелин, солевой раствор). Концентрация аллергена составляет 5–30%. Результат аппликационного теста оценивают через 20 минут, 12 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа и окончательно через 7 суток [33]. За рубежом имеются готовые тест-системы в виде панелей, включающих набор различных аллергенов. В одном из вариантов аллергены в виде растворов помещены в маленькие алюминиевые или пластмассовые камеры, прикрепленные к коже липкой лентой, в другом аллергены помещены в гидрофильный слой геля, нанесенный на лоскут полиэфира, который покрыт акриловым клеем. Для определения аллергии к стоматологическим материалам используют панели производителей различных стран: International Contact Dermatitis Group, European Standard and Dental Material Series, Chemotechnic Dental Screening Series, TRUE Standard Series, German Contact Dermatitis Series, Stomatitis and Dental Hygienist Series, Dental Screening Series. В большинство панелей входят растворы солей золота, палладия, цинка, кобальта, хрома, никеля, железа в концентрациях порядка г/100 мл или моль/л. Растворы солей металлов могут различаться анионами (хлориды, сульфаты, нитраты) и растворителями (вода, спирт, вазелин). Этим можно объяснить различия при оценке результатов аппликационных тестов. Общая чувствительность метода составляет 50% [29].

Таким образом, кожные пробы в любом варианте имеют ограничения.

Во-первых, они могут давать *ложноотрицательные* результаты при наличии аллергии. Причинами могут быть:

- снижение кожной чувствительности из-за приема антигистаминных препаратов, кортикостероидов, трициклических антидепрессантов, антимедиаторных средств, адреналина;
- изменение реактивности кожи, связанное с физиологическими особенностями организма, — детский и старческий возраст, острый период заболевания;
- неадекватная (низкая) концентрация аллергена;

- другая химическая форма аллергена (например, ионы металлов другой ковалентности, комплексы вещества с другими соединениями);
- часто аллергенами являются не сами исследуемые вещества, а продукты их метаболизма.

Ложноположительные результаты могут наблюдаться в следующих случаях:

- при нарушении техники постановки кожного тестирования и изменении свойств аллергенов (низкий рН, изменение осмолярности растворов, инъекции большого объема аллергена при внутрикожном тестировании);
- при приеме лекарственных препаратов и пищевых продуктов, являющихся гистаминолибераторами;
- при выраженном кожном дермографизме, в случае наличия в исследуемом аллергене технологических примесей, которые сами могут дать аллергическую реакцию.

Ulrich с соавторами [32] описывает редкую причину ложноположительных патч-тестов в случае сенсibilизации к вазелину и этиловому спирту.

В случае расхождения данных анамнеза и результатов кожного тестирования возникает необходимость постановки провокационных тестов. Целью провокационных тестов является воспроизведение симптомов аллергического заболевания в шоковом органе-мишени. Провокационные тесты являются золотым стандартом диагностики [33]. В действительности, провокационные тесты наиболее полезны в диагностике случаев гиперчувствительности немедленного типа. Но основное их предназначение — зафиксировать факт того, что побочная реакция не случится или альтернативное лекарство (материал) хорошо переносимо. Важно помнить, что в случае тяжелых аллергических реакций постановка провокационных тестов противопоказана [34]. Более того, реакции гиперчувствительности замедленного типа трудно подтвердить или опровергнуть путем постановки провокационных тестов: отсутствуют сопутствующие факторы, доза, воспроизводимая симптомы, часто не достигается, симптомы могут возникать у пациентов дома. Важно помнить, что провокационные пробы должны проводиться только в период ремиссии заболевания. Противопоказания такие же, как и для постановки кожных тестов. В случае необходимости постановки провокационных тестов к этим противопоказаниям добавляются следующие:

- генерализованные буллезные высыпания;
- токсический эпидермальный некролиз;
- синдром Стивенса–Джонсона;
- эксфолиативный дерматит;
- реакция повышенной чувствительности с эозинофилией;
- системный васкулит;
- анафилактический шок;

- органоспецифические проявления (цитопении, васкулиты, гепатиты, нефриты, пневмониты);
- лекарственно-опосредованные аутоиммунные болезни (СКВ-подобный синдром, вульгарная или буллезная пузырчатка).

В зависимости от вида аллергена и способа его введения различают назальный, конъюнктивальный, ингаляционный, пероральный и подъязычный провокационные тесты. Подъязычный провокационный тест используют в случае лекарственной аллергии. Аллерген наносится на слизистую оболочку подъязычной области — 1/8–1/4 таблетки или 2–3 капли раствора. Продолжительность экспозиции составляет 5–10 минут. При положительной пробе (появление отека слизистой, гиперемии, зуда и т. д.) остаток препарата извлекается и рот прополаскивается физиологическим раствором. Подъязычный провокационный тест проводится крайне редко из-за его низкой специфичности.

Данный тест основан на использовании высоких доз предполагаемого аллергена, который воздействует на всю слизистую оболочку полости рта. К.А. Лебедев и соавт., 2003 [35] предложили для диагностики аллергии к местным анестетикам и протезным материалам использовать микровариант этого теста, названный авторами слизистодесневым тестом. В основе этого теста лежит воздействие минимальной дозы аллергена на локальный участок слизистой оболочки полости рта. Суть его состоит в том, что раствор препарата в разведении 10^{-7} от терапевтического на лигниновом диске диаметром 8–10 мм прикладывают к десне в щечную область. Длительность аппликации — 50 минут. Делают смывы из полости рта физиологическим раствором до и после аппликации диска и оценивают изменение числа эмигрирующих лейкоцитов в полость рта. Если количество клеток во втором смыве по сравнению с первым повысилось более чем вдвое, диагностируют повышенную реакцию на препарат.

Для диагностики лекарственной аллергии в России применяется тест торможения естественной эмиграции лейкоцитов *in vivo* (ТТЭЛ), предложенный академиком А.Д. Адо. Тест основан на торможении миграции лейкоцитов в полости рта под влиянием специфического лекарственного аллергена. В ГНЦ Институте иммунологии ФМБА разработана методика теста, рабочие концентрации различных групп медикаментов [36].

Принцип с использованием возрастающих доз препарата (градуированная провокация) состоит в ведении малых доз лекарственного средства с определением интервала до достижения терапевтической дозы лекарственного средства. Эта процедура может производиться лишь специалистами, прошедшими специальную подготовку. При подготовке к проведению теста следует учесть соотношение риск/польза и получить информированное согласие от пациента.

В целом, все пробы *in vivo* опасны и могут проводиться тогда, когда невозможно обойтись без их применения.

Тесты *in vitro*

В этой группе методов используется материал, взятый у пациента, — обычно периферическая кровь.

Лабораторно-клиническое исследование крови

Оценка количества эозинофилов в периферической крови считается важным признаком аллергического воспаления. Диагностически значимым является повышение эозинофилов крови свыше 5%. Однако в случае непереносимости протезных материалов и анестетиков эозинофилия встречается крайне редко, и чаще это сочетается с сопутствующей атопической конституцией и аллергией к неинфекционным аллергенам (ингаляционным, пищевым).

Некоторые врачи-стоматологи пытаются соотнести повышение количества лейкоцитов периферической крови с аллергическими реакциями на анестетики и протезные материалы, но это неверно. Действительно, лейкоцитоз часто сопутствует этим состояниям, но вызвано подобное повышение другими причинами [37].

Аллергодиагностика *in vitro*

В настоящее время абсолютно достоверных методов диагностики аллергии лабораторными методами не существует. Иммунологический механизм нежелательного действия местных анестетиков и стоматологических материалов сложен, поэтому один тест не может дать всю информацию о механизме аллергической реакции.

Лабораторная диагностика является вспомогательным методом в диагностике аллергических реакций и проводится при несопадении данных аллергологического анамнеза и результатов кожных и/или провокационных тестов.

Основными показаниями для назначения лабораторных методов аллергодиагностики, которые проводятся *in vitro*, являются:

- ранний детский возраст;
- период беременности и лактации;
- системные аллергические реакции на кожные пробы в анамнезе;
- непрерывно рецидивирующее течение аллергического заболевания без периодов ремиссии;
- дифференциальная диагностика между IgE-зависимыми и не-IgE-зависимыми механизмами аллергических реакций;
- дермографизм и распространенный дерматит;
- невозможность отмены антигистаминных и антимедиаторных препаратов, глюкокортикостероидных гормонов, трициклических антидепрессантов и других препаратов, влияющих на результаты кожных проб;
- поливалентная сенсibilизация, когда нет возможности провести тестирование со всеми предполагаемыми аллергенами в ограниченные сроки обследования;

- резко измененная реактивность кожи;
- ложноположительный и ложноотрицательный результат при кожном тестировании;
- отрицательное отношение больного к кожным пробам;
- несоответствие результатов кожных проб, провокационных тестов данным анамнеза и клинической картине.

Таковы основные показания для аллергодиагностики *in vitro* в общеклинической практике. Учитывая, что в случае аллергии к стоматологическим материалам возможность постановки кожных и провокационных тестов ограничена, важность лабораторных методов диагностики весьма велика.

Основными преимуществами методов специфической аллергодиагностики *in vitro* являются:

- безопасность для больного;
- высокая информативность;
- возможность проведения исследований в случае, когда больной находится на большом расстоянии и может быть доставлена сыворотка больного;
- малое количество крови, необходимое для анализа.

Лабораторная диагностика аллергических заболеваний в стоматологической практике включает в себя диагностические и прогностические методы.

Диагностические методы

Прежде всего, необходимо выделить патогенетический механизм аллергической реакции: по какому типу (немедленному или замедленному типу гиперчувствительности) развилась аллергическая реакция?

Romano и соавт., 2011 [38] рассматривают наиболее приемлемые диагностические тесты при аллергических реакциях на лекарства. Среди тестов *in vitro* для диагностики аллергических реакций немедленного типа предпочтение отдается различным методикам определения специфического иммуноглобулина E и тесту активации базофилов (BAT), выполненному методом проточной цитометрии. Реакции гиперчувствительности замедленного типа рекомендуют подтверждать следующими лабораторными методами: тест трансформации лимфоцитов (LTT) [39] и тест активации лимфоцитов (LAT) [40].

Лабораторная диагностика IgE-зависимых реакций

Определение специфических иммуноглобулинов класса E *in vitro* является одним из самых распространенных методов диагностики аллергических реакций немедленного типа. Знаменательное событие в истории аллергологии — одновременное открытие японскими учеными (Teruco Ishizaka и Kimshige Ishizaka) и шведскими исследователями (Hans Bennich и Gunnar Johansson) в 1967 г. иммуноглобулина E (IgE) предвредило создание лабораторных тест-систем для определе-

ния специфических IgE к различным аллергенам. Для количественного определения аллерген-специфических антител используют разнообразные методы, в основе которых лежит следующий принцип: аллерген, ковалентно связанный с твердыми частицами, инкубируют с сывороткой больного, предположительно содержащей IgE-антитела против исследуемого аллергена. Находящиеся в сыворотке антитела связываются с аллергеном, фиксируясь на частицах твердой фазы. Добавление вторых анти-IgE-антител, меченых различными метками (радиоиммунной, ферментной, флуоресцентной), позволяет количественно оценить содержание аллерген-специфических антител. Впервые этот принцип был применен в методе радиоаллергосорбентного теста (РАСТ), который и поныне является «золотым» стандартом аллергодиагностики *in vitro* [41].

Радиоаллергосорбентный тест (РАСТ)

С помощью этого метода производится количественное определение аллерген-специфических антител в крови. Аллерген, соединенный ковалентно с бумажным диском, реагирует со специфическим IgE крови больного. После отмывания неспецифического IgE добавляют радиоактивно меченный «I-125» анти-IgE. Образуется комплекс специфического IgE + меченный анти-IgE. Радиоактивность этого комплекса измеряют с помощью гамма-счетчика. Чем больше радиоактивность, тем выше содержание специфического IgE в крови больного. Для измерения общего и аллерген-специфических IgE используют стандартные наборы (панели аллергенов) (рис. 1).

Иммуноферментный анализ (ИФА) является одним из самых распространенных методов исследования. С помощью иммуноферментного анализа производится количественное определение аллерген-специфических IgE-антител крови больного. Принцип метода заключается в том, что на первом этапе исследования испытуемый аллерген ковалентно связывается с твердой фазой (бумажный диск, активированный полимер). При добавлении сыворотки больного происходит связывание аллергена, фиксированного на твердой фазе, с антителом, если в сыворотке присутствует соответствующее данному аллергену антитела. После отмывания не связавшихся IgE добавляются антитела против IgE, меченные флуорохромом (пероксидазой хрена, бета-галактозидазой и др.). Происходит образование комплекса: аллерген на твердой фазе + специфический IgE + антитела анти-IgE. Не связавшиеся антитела удаляются (рис. 2).

Уровни специфического IgE-связывания определяются по интенсивности свечения (реакция оценивается в интервале 1–4 класса). Чем выше показатель свечения по отношению к негативному контролю (сыворотка, в которой отсутствуют специфические IgE-антитела), тем больше специфических IgE в сыворотке пациента.

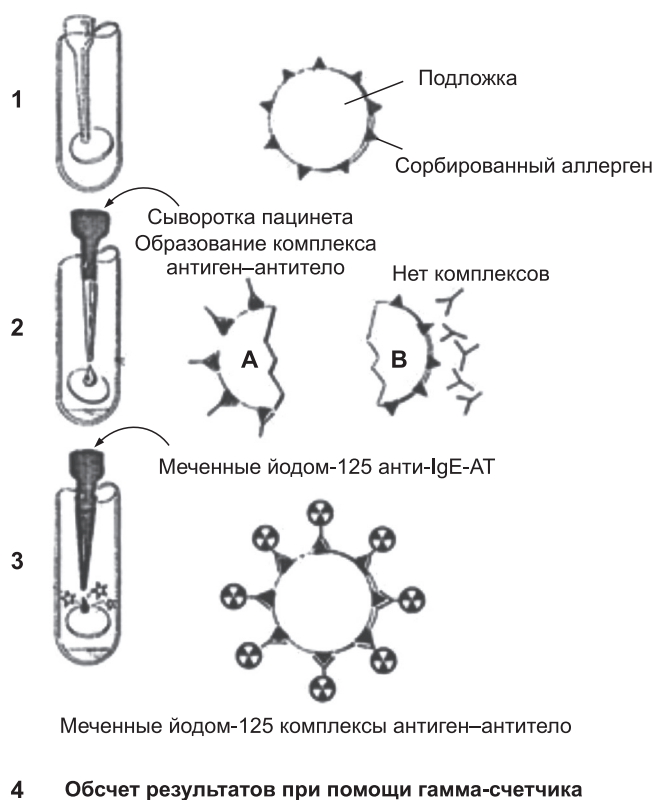


Рис. 1. Схема проведения РАСТ

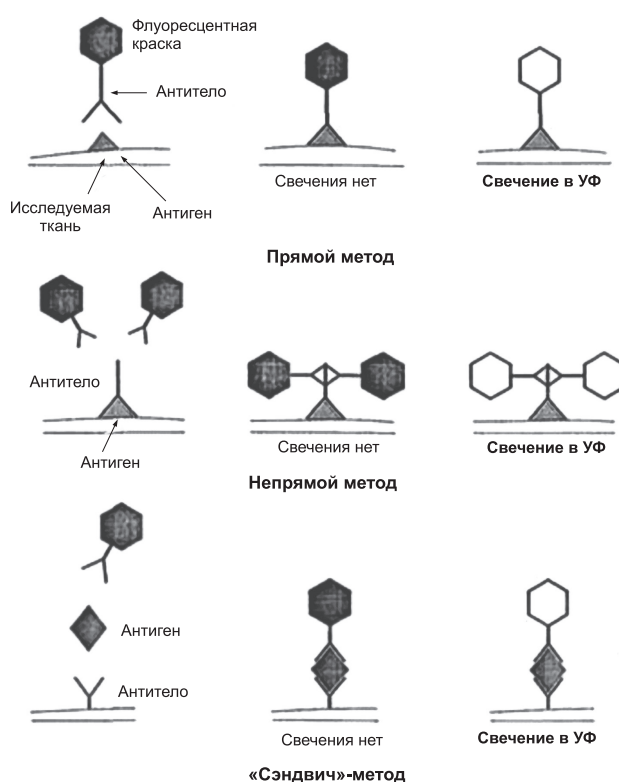


Рис. 2. Схема ИФА

Специфический характер реакции учитывается на основе позитивного контроля (IgE-связывание интенсивности 4 класса).

Ценность этого метода состоит в том, что для его проведения сразу с большим количеством аллергенов требуется небольшое количество сыворотки.

Для определения IgE в сыворотке крови больных применяются **методы, основанные на эффекте хемилюминесценции**. Принцип постановки такой же, как и в ИФА и РАСТ, однако в качестве индикации реакции используются фторреагенты (например, в системах UNICAP-100 или MAST-CLA) (рис. 3), свечение которых регистрируется на пленке Polaroid, на фотометре.

Специфические антигены обнаруживают при помощи ELISA-теста (рис. 4).

При лекарственной аллергии используется метод определения аллерген-специфических IgE-антител для диагностики atopических реакций. В коммерческих тест-системах лекарство (гаптен) предварительно конъюгируется с носителем. Этот комплекс соединяется с твердой фазой, который инкубируется с сывороткой пациента. Количество связанных специфических IgE-антител соответственно определяется вторичными антителами, мечеными радиоизотопами (РИА), ферментной меткой (ИФА) или флуоресцентной (ФИФА). Описаны нанотехнологии, использующие новые носители для лекарств в виде полиамидаминодендример (ПАМАМ) [42]. Ре-

зультаты определения специфического IgE выражаются количественно в виде kUA/L в диапазоне 0,00–100 kUA/L, где положительный результат тестируется от 0,35 kUA/L. Специфичность различных методов определения IgE-антител при лекарственной аллергии достигает 90%, а чувствительность 50% [43]. Наиболее хорошо изучена диагностическая ценность определения специфических IgE-антител к бета-лактамым антибиотикам, нестероидным противовоспалительным средствам, миорелаксантам. Имеются немногочисленные исследования, посвященные этой теме при аллергии к протезным материалам [37]. Частота выявления специфических IgE-антител при аллергонепереносимости в стоматологической практике составила, как указывают авторы, – 15–20% случаев.

Приводим собственные данные о диагностической ценности определения Ig-E антител при аллергии к местным анестетикам и протезным материалам. При амбулаторном обращении в Северо-Западный медицинский центр Росздрава (ныне Национальный медико-хирургический центр им. Н.И. Пирогова) было обследовано 55 пациентов с указанием на непереносимость местных анестетиков (группа А) и 317 пациентов с симптомами непереносимости протезных материалов (группа Б).

Мы исследовали специфические IgE-антитела в сыворотке пациентов. Исследования проводились методом ИФА (Bio-Tec Instruments, реагенты DoctorFOOKE, Германия). Мы исследовали пациентов с противоречивы-

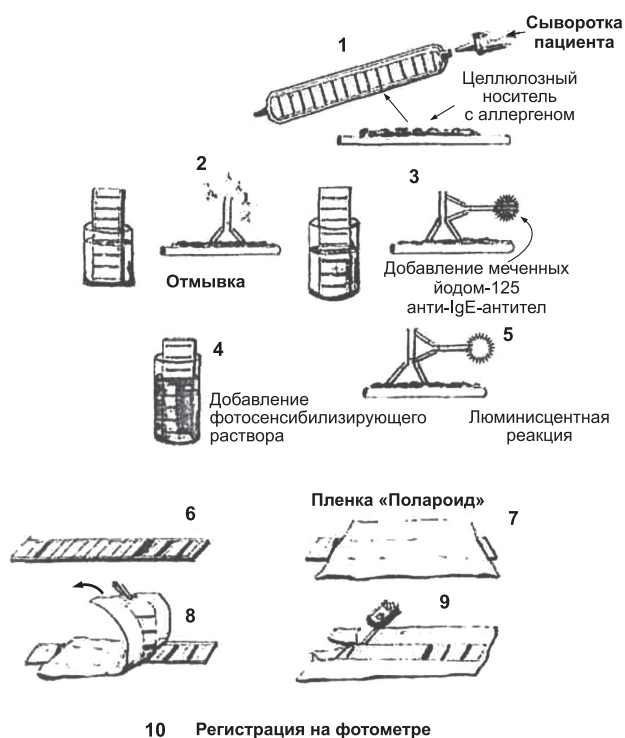


Рис. 3. Схема MAST-CLA-теста

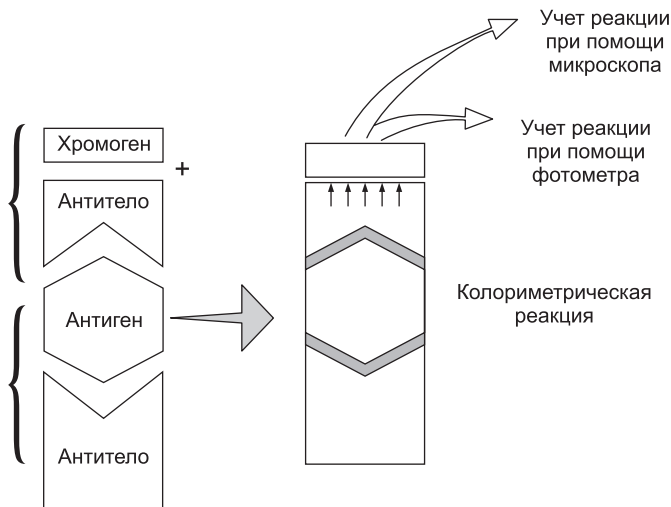


Рис. 4. Схема ELISA-теста.

ми результатами аллергологического анамнеза и данных прик-тестов (группа А) и аппликационных тестов (группа Б). Провокационные тесты не применялись у этих больных ввиду наличия в анамнезе поливалентной аллергии. В группе А было женщин — 41, мужчин — 14, средний возраст 38,4 (6–80), в группе Б женщин — 229, мужчин — 88, средний возраст — 54 года (31–82).

Для определения аллергоспецифического IgE мы использовали аллергены местных анестетиков в виде дисков или в жидкой фазе (бупивакаин, тетракаин, прокаин, мепивакаин, бензокаин, прилокаин, лидокаин, ультракаин) и протезных материалов в виде дисков

(кобальт, медь, платина, никель, золото, хром, палладий, акрил). Применялись специальные аллергены для исследований *in vitro* производства фирмы DoctorFOOKE.

Результаты: положительные уровни IgE-антител были обнаружены в 13 случаях (14,8%) в группе А (больные с аллергией к местным анестетикам). В группе Б (при аллергии на протезные материалы) IgE-специфические антитела были положительные на акрил в 17,4% случаев. При исследовании аллергии к металлам процент положительных IgE-антител был следующим: к никелю — у 33,3%, кобальту — 31,8%, хрому — 28,3%, платине — 27,3%, меди — 25,4%, золоту — 23,1%, палладию — 21,2% пациентов. Наш опыт позволяет заключить, что определение IgE-антител при аллергии к местным анестетикам и протезным материалам является полезным и надежным инструментом диагностики. Аллергические реакции немедленного типа на местные анестетики встречаются достаточно редко, это скорее «миф», чем реальность. Атопические реакции на протезные материалы встречаются чаще в сравнении с реакциями на местные анестетики, но не охватывают весь спектр реакций непереносимости [44, 45, 46].

В настоящее время редко применяют для диагностики атопических реакций непрямой базофильный тест (тест Шелли). Он основан на изучении морфологических изменений базофилов кролика в результате взаимодействия сыворотки больного и специфического аллергена. Краситель нейтральный красный избирательно окрашивает гранулы базофилов. Положительная реакция проявляется деформацией клеток, образованием псевдоподий и выходом гранул из клетки. Прямой базофильный тест основан на изучении морфологических изменений базофилов в периферической крови пациента под влиянием аллергена.

Предложены новые методы клеточной диагностики аллергии, основанные на модифицированном тесте Шелли — тесте дегрануляции базофилов. Базофилы и мастоциты играют центральную роль в аллергических реакциях немедленного типа. Ebo D.G. et al. [43] указывают на возрастающий интерес исследователей к тесту активации базофилов (ВАТ), в котором активация указанных клеток измеряется методом проточной цитометрии. С помощью теста активации базофилов (ВАТ) определяются специфические маркеры, которые экспрессируются на поверхности базофилов крови после их инкубации с соответствующим лекарственным аллергеном. В настоящее время наиболее часто используются такие маркеры активации базофилов, как CD63 и CD203c. Сообщается, что чувствительность и специфичность ВАТ при аллергии к миорелаксантам варьирует от 36 до 92% и от 93 до 100% соответственно [47], а при аллергии к бета-лактамам антибиотикам чувствительность колеблется от 33 до 67%, а специфичность от 79 до 100% [48]. Можно считать метод ВАТ весьма перспективным для оценки аллергических реакций немедленного типа в стоматологической практике, однако в литературе мы пока

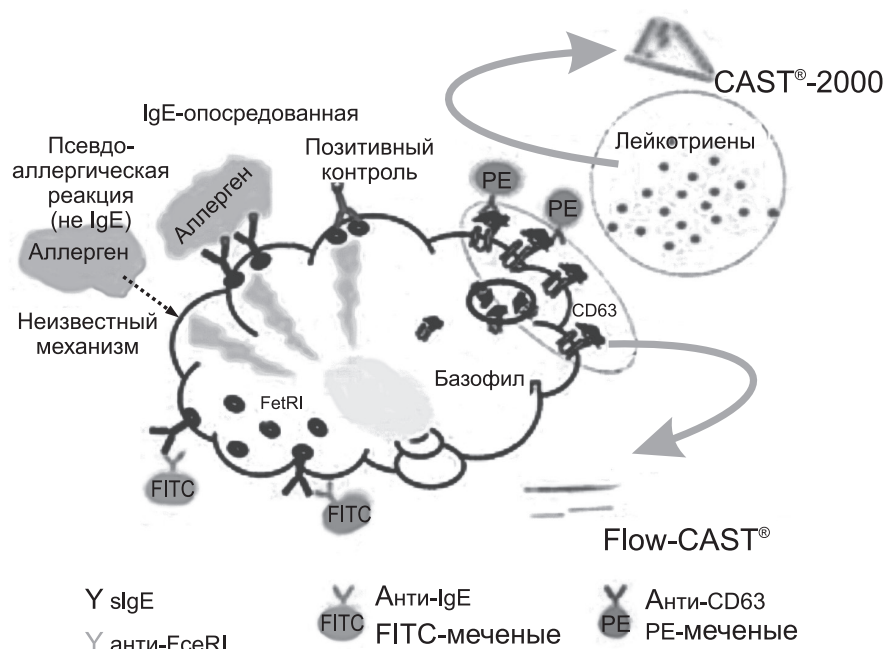


Рис. 5. Принцип CAST-теста

не нашли подобных сообщений, что может послужить предметом наших будущих исследований.

При контакте аллергена с молекулами IgE на базофилах и мастоцитах происходит каскад ферментных реакций, приводящий к синтезу и секреции медиаторов аллергического воспаления, в том числе лейкотриенов. Лейкотриены синтезируются также и в случае псевдоаллергических реакций, то есть без участия IgE. Компанией Buhlmann Laboratories (Швейцария) был разработан тест стимуляции базофилов *in vitro* — метод CAST. Технология CAST (Cellular Antigen Stimulation Test, тест антигенной стимуляции клеток) основана на определении сульфидолейкотриенов (LTC₄, LTD₄, LTE₄), секретируемых примированными И-3 базофилами под действием аллергенов *in vitro*. Его также называют провокационным тестом *in vitro*. Метод патентован, авторы — проф. DeWeck и д-р Sainte-Laudy. Благодаря синтезу сульфидолейкотриенов (sLT) *de novo* анализ CAST обладает высочайшей точностью. В качестве позитивного контроля для каждого образца используют моноклональные антитела к высокоаффинному рецептору для IgE (FcεRI), обеспечивающие имитацию связывания IgE-антител с рецепторов на мембране базофилов, что повышает специфичность метода (рис. 5).

Реакция высвобождения гистамина (по Scov P. et al.) из базофилов периферической крови человека основана на учете процентов высвобождения гистамина после обработки базофильных клеток специфическими аллергенами.

Исследование IgG-антител не относится к собственно диагностическим тестам и проводится, как правило, в комплексе с определением IgE-антител. По данным

литературы, роль IgG-антител к аллергенам до конца не ясна. Полагают, что имеется по крайней мере два функционально различающихся вида IgG4-антител, к одному из которых относятся блокирующие антитела, а к другому — анафилактические. Известно, что в сыворотке больных поллинозом после успешной аллерген-специфической иммунотерапии повышается уровень IgG4-антител, что сопровождается смягчением симптомов заболевания. В то же время, у нелеченных больных уровень IgG4-антител не изменяется. Специфические IgG-антитела часто встречаются при пищевой аллергии, в то время как доказано, что наличие IgG-антител может быть отражением неумеренного потребления пищевых продуктов, а отнюдь не свидетельством аллергии. Существуют исследования, в которых не доказана связь между наличием в сыворотке крови специфических IgG-антител и IgG4-антител к аллергену, с клиническими проявлениями атопии. Однако известно, что IgG-антитела характеризуют частоту контактов с аллергеном.

Практически не существует исследований, посвященных роли IgG-антител при лекарственной аллергии. Внутрикожные тесты при оценке отсроченных реакций через 6 и 24 часа часто бывают отрицательными. Тест трансформации лимфоцитов (ЛТТ) также является отрицательным. Наиболее распространен иммуноферментный метод определения IgG-антител, однако мы не нашли в доступной литературе сведений об изучении роли IgG-антител при аллергии в стоматологической практике.

Приводим собственные данные о диагностической ценности определения Ig-G антител при аллергии к местным анестетикам и протезным материалам. При амбулаторном обращении в Северо-Западный медицинский центр Росздрава (ныне Национальный медико-хирургический центр им. Н.И. Пирогова) было обследовано 54 пациента с указанием на непереносимость местных анестетиков (группа А) и 264 пациента с симптомами непереносимости протезных материалов (группа Б).

Мы исследовали специфические IgG-антитела в сыворотке пациентов. Исследования проводились методом ИФА (Bio-TecInstruments, реагенты DoctorFOOKE, Германия). В группе А было женщин — 40, мужчин — 14, средний возраст 39,1 (6–80), в группе Б женщин — 201, мужчин — 63, средний возраст 57 лет (31–82).

Для определения аллергоспецифических IgG-антител мы использовали аллергены местных анестетиков

(мепивакаин, прилокаин, лидокаин, артикаин) и протезных материалов (кобальт, медь, платина, никель, золото, хром, палладий). Применялись специальные аллергены для исследований *in vitro* производства фирмы Doctor FOOKE, которые были сорбированы на твердой фазе (в лунках планшета в виде стрипов).

Результаты: положительные уровни IgG-антител были обнаружены в группе А (больные с аллергией к местным анестетикам): мепивакаин — 1,8%, артикаин — 2,4%, лидокаин — 4%, прилокаин — 1%. В группе Б (при аллергии на протезные материалы) процент положительных IgG-антител был следующим: к никелю — у 21,8%, кобальту — 21,7%, хрому — 20,3%, платине — 20,7%, меди — 13,4%, золоту — 33,1%, палладию — 4,9% пациентов.

Совпадение положительных проб по классам IgE и IgG не всегда было однозначным. Наличие IgG-антител свидетельствовало, как правило, о предшествующем контакте с определенным протезным материалом. При определении IgG-антител к местным анестетикам пробы были чаще отрицательными, так как исследовали лекарства, ранее не применявшиеся у пациента (цель — подбор анестетика). Наш опыт позволяет заключить, что определение IgG-антител при аллергии к местным анестетикам и протезным материалам является вспомогательным инструментом диагностики и должно интерпретироваться совместно с данными определения IgE-антител.

Таким образом, лабораторные методы аллергодиагностики выявляют только состояние сенсибилизации, то есть наличие IgE (IgG) антител или сенсибилизированных лимфоцитов, подтверждая, что у обследуемого пациента имелся контакт с данным аллергеном. Указанные тесты не могут являться бесспорным доказательством того, что на данный аллерген разовьется аллергическая реакция, так как для возникновения и развития аллергической реакции недостаточно лишь наличия сенсибилизации и аллергена. Лабораторные методы аллергодиагностики определяют аллергенспецифические молекулы, продукты аллергенспецифического ответа клеток и тканей, что не равнозначно наличию и степени аллергенспецифической гиперчувствительности организма и не характеризует клинически значимого аллергена.

Методы лабораторной диагностики рассматривают в качестве дополнительных мер, позволяющих уточнить сомнительные результаты диагностики *in vivo*. Постановка диагноза должна базироваться в основном на данных аллергоанамнеза, осмотра больного, результатов постановки кожных проб и провокационных тестов, а также данных общеклинического обследования пациента.

Бесспорным является тот факт, что в современных условиях аллергодиагностика *in vitro* служит важным подспорьем для диагностики аллергии.

Уметь ответить на вопрос «Есть ли аллергия у пациента или нет?» должны не только профессиональные

аллергологи, но и практические врачи-стоматологи, к которым часто обращаются за помощью больные с симптомами непереносимости местных анестетиков и/или протезных материалов, но которые не имеют возможности и юридического права производить аллергодиагностику *in vivo*. В таких случаях могут использоваться лабораторные тесты, простые в обращении и доступные для медицинских учреждений.

Литература

1. Лебедев К.А., Митронин А.В., Поныкина И.Д. Непереносимость зубопротезных материалов. М.: Книжный дом «Либроком», 2010.
2. Strachan D.P. Family size, infection and atopy: the first decade of the «hygiene hypothesis». *Thorax*, 2000; 55 (1): 2–10.
3. Naisbitt S. et al. Interaction of the postsynaptic density-95/guanylate kinase domain-associated protein complex with a light chain of myosin-V and dynein. *J. Neurosci.* 2000: 20.
4. Coombs P.R., Gell P.G.H. Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease / Eds. P.G.H. Gell. 1968: 575–596.
5. Pichler W.J. Delayed drug hypersensitivity reactions — new concepts. *Annals of Internal Medicine.* 2003; 139: 683–693.
6. Spanou Z., Keller M., Britschgi M. et al. Involvement of drug specific T-cells in acute drug-induced intestinal nephritis. *Journal of the American Society of Nephrology.* (n.d.); 11176: 2919–2927.
7. Zanni M.P., von Greyerz S., Schnyder B. et al. HLA-restricted, processing- and metabolism-independent pathway of drug recognition by human alpha beta T lymphocytes. *The Journal of Clinical Investigation.* 1998; 102: 1591–1598.
8. Hari Y. et al. Distinct serum cytokine levels in drug and measles-induced exanthema. *Int. Arch. Allerg. Immuno.* 1999 Nov; 120 (3): 225–229.
9. Naisbitt D.J., Gordon S.F., Pirmohamed M., Park B.K. Immunological principles of adverse drug reactions: the initiation and propagation of the immune responses elicited by drug treatment. *Drug Saf.* 2000; 23: 483–507.
10. Britschgi M., Steiner U.C., Schmid S. et al. T-cell involvement in drug-induced acute generalized exanthematous pustulosis. *J. Clin. Invest.* 2001; 107: 1433–1441.
11. Лебедев К.А., Поныкина И.Д. Иммунология образраспознающих рецепторов (интегральная иммунология). М.: Книжный дом «ЛИБРОКОМ»/URSS, 2009.
12. Лебедев К.А., Поныкина И.Д. Физиология регуляции адаптивного иммунитета сигнальными образраспознающими рецепторами. *Физ. Человека.* 2009; 35 (1): 121–129.
13. Klein R., Schwenk M., Templeton D.M. Cytokine profiles in human exposure to metals. *Pure. Appl. Chem.* 2006; 78 (11): 2155–2168.
14. Walsh L.J. Mast cells and oral inflammation. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine.* 2003; 14 (3): 188–198.
15. Weltsien H.U. Lessons from nickel hypersensitivity: structural findings. In: *Drug hypersensitivity / P. W.G. (Ed.). Basel: Karger (n. d.): 47–54.*
16. Vital A.L. et al. The sensitizes nickel sulfate and 2,4-dinitrofluorobenzene increase CD40 and IL-12 receptor expression in the fetal dendritic cell line. *Biosci Rep.* 2004; 24 (3): 191–202.
17. Griem P., Wulferink M., Sachs B., Gonzales J.B., Gleichmann E. Allergic and autoimmune reactions to xenobiotics: how do they arise? *Immunol. Today.* 1998; 19: 133–141.
18. Levine B.B., Ovary Z. Studies in mechanism of the formation of the penicillin antigen III. The N (D-Benzylpenicilloyl) group as an

- antigenic determinant responsible for hypersensitivity to penicillin. *J. Exp. Med.* 1961; 114: 68–75.
19. *Orasch C.E., Helbbing A., Zanni M.P., Yawalkar N., Hari Y., Pichler W.J.* T-cell reactions to local anaesthetics: relationship to angioedema and urticarial after subcutaneous application. Patch testing and LTT in patients with adverse reactions to local anaesthetics. *Clin. Exp. Allergy.* 1999; 29: 1549–1554.
20. *Schwartz H.J., Sher T.H.* Bisulfite sensitivity manifesting as allergy to local dental anaesthesia. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1985; 75: 525.
21. *Charous B.L., Blanco C., Tarlo S., Hamilton R.G., Baur X., Beezhold D. et al.* Natural rubber latex allergy after 12 years: recommendations and perspectives. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2002; 109: 31–34.
22. *Kurup V.P., Fink N.J.* The spectrum of immunologic sensitization in latex allergy. *Allergy.* 2001; 56: 2–12.
23. *Цимбалистов А.В., Михайлова Е.С., Шабашова Н.В.* и др. Иммунологические аспекты патогенеза непереносимости стоматологических конструкционных материалов. *Стоматология.* 2006; 4: 47–60.
24. *Bousquet J.* Pathophysiology of skin tests. *Allergy.* 1993; 48 (14): 49–54.
25. *Torres M.J.* et al. Diagnosis of immediate allergic reactions to beta-lactam antibiotics. *Allergy.* 2003; 58: 961–972.
26. *Brockow K., Romano A., Blanka M. et al.* General considerations for skin-test procedures in the diagnosis of drug hypersensitivity. *Allergy.* 2002; 57: 45–51.
27. *Fisher M.M., Bowey C.J.* Alleged allergy to local anaesthetics. *Anaesth. Intens. Care.* 1997; 25 (6): 661–664.
28. *Adkinson N.F.* Diagnosis of immunologic drug reactions. *N. Engl. Reg. Allergy Proc.* 1984; 5: 104.
29. *Barbaud A.* Drug skin tests and systemic drug reactions: an update. *Expert Rev. Dermatol.* 2007; 2: 481–495.
30. *Axell T., Spiechowicz E., Glanz P.O., Andersson G., Larsson A.* A new method for intraoral patch-testing. *Contact dermatitis.* 1986; 15 (8): 58–62.
31. *Barbaud A., Goncalo M., Bruynzeel D., Bircher A.* Guidelines for performing skin tests with drugs in the investigation of cutaneous drug reactions. *Contact Dermatitis.* 2001; 45: 321–328.
32. *Ulrich G., Schmutz J.L., Trechot P.* et al. Sensitization to petrolatum: an unusual cause of false-positive patch-tests. *Allergy.* 2004; 59: 1006–1009.
33. *Messaard D., Sahla H., Benahmed S., Godard P., Bousquet J., Demoly P.* Drug provocation tests with a history suggesting an immediate drug hypersensitivity reaction. *Ann. Intern. Med.* 2004; 140: 1001–1006.
34. *Aberer W., Bircher A., Romano A.* et al. Drug provocation testing of drug hypersensitivity reactions: general considerations. *Allergy.* 2003; 58: 854–863.
35. *Лебедев К.А., Максимовский Ю.М., Кулмагоматов И.Р.* и др. Слизисто-десневый тест для определения гиперчувствительности к местным анестетикам. *Маэстро стоматология.* 2003; 12: 74–78.
36. *Адо А.Д., Порошина Ю.А., Лусс Л.В.* и др. Тест торможения естественной эмиграции лейкоцитов ин vivo (ТТЭЛ) для специфической диагностики лекарственной аллергии: Методические рекомендации. М., 1986.
37. *Mallo P.L., Diaz D.C.* Intraoral contact allergy to materials used in dental practice. A critical review. *Med. Oral.* 2003; 8 (5): 334–347.
38. *Romano A.* et al. Diagnosis and management of drug hypersensitivity reactions. *J. Allergy Clin. Immunol.* (n.d.); 127 (3).
39. *Pichler W.J., Tilch J.* The lymphocyte transformation test in the diagnosis of drug hypersensitivity. *Allergy.* 2004; 59: 1153–1160.
40. *Beeler A., Zaccaria L.* CD69 upregulation on T-cells as in vitro marker for delayed-type drug hypersensitivity. *Allergy.* 2008; 63: 181–188.
41. *Wide L., Bennich H., Johansson S.G.O.* Diagnosis of allergy by an vitro test for allergic antibodies. *Lancet.* 1967; 2: 1105.
42. *Montanez M.I., Perez-Inestrosa E., Suau R., Mayorga C., Torres M.J., Blanca M.* Dendrimerized cellulose as scaffold for artificial antigens with application in drug allergy diagnosis. *Biomacromolecules.* 2008; 9: 1461–1466.
43. *Ebo D.G., Leysen J., Mayorga C., Rozieres A., Kno E.F., Terreehorst I.* The in vitro diagnosis of drug allergy: status and perspectives. *Allergy.* 2011.
44. *Lazarenko L.* Detection of IgE Antibodies in Dental Allergy. Is it true? *Scandinavian Journal of Immunology.* 2010, June; 71 (6): 496.
45. *Lazarenko L.* Monitoring of IgE-antibodies in dental allergy. *Allergy.* 2011, June; 66 (94): 368.
46. *Lazarenko L.* Detection of IgE-antibodies in dental allergy practice. *Peschiera del Garda (Verona): 5th Eurobat meeting «New developments in laboratory drug allergy diagnosis» // Abstracts from the Drug Allergy Interesting Group.* 2011, September: 10.
47. *Sanz M.L., Gamboa P.M., Mayorga C.* Basophil activation test in the evolution of immediate drug hypersensitivity. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2009; 9: 298–304.
48. *Hausmann O.V., Gentinetta T., Bridts C.H., Ebo D.G.* The basophil activation test in immediate-type drug allergy. *Immunol Allergy Clin. North Am.* 2009; 29: 555–566.

РАННЯЯ ДИАГНОСТИКА НАСЛЕДСТВЕННОГО СФЕРОЦИТОЗА КАК ПРОФИЛАКТИКА ДЕФОРМАЦИИ ЛИЦЕВОГО СКЕЛЕТА

Ю.А. ПРОХОРОВА*, Н.Е. СОКОЛОВА**, Е.Е. ЗУЕВА*

* ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский Государственный медицинский университет
им. акад. И.П. Павлова» Минздравсоцразвития России

** ГУЗ «ДГБ № 1», Санкт-Петербург

Резюме. Одна из распространенных причин наследственных гемолитических анемий — полная или частичная утрата одного или нескольких белков цитоскелета эритроцитов. Наследственный сфероцитоз — наиболее встречающаяся из мембранопатий эритроцитов, распространенность этой болезни составляет 1 случай на 10 000 взрослого населения или 1 случай на 2–5 тысяч младенцев и встречается у лиц большинства этнических групп. Наследственный сфероцитоз (НС) обусловлен нарушениями вертикальных связей в цитоскелете в результате дефектов анкирина, спектрина, белка полосы 3 и некоторых других белков, прикрепляющих цитоскелет эритроцита к клеточной мембране. Предложенный в 2000 году метод связывания флуоресцентного красителя эозин-5 малеимида (э5м) с лизином-430 первой внеклеточной петли белка полосы 3 мембран эритроцитов позволяет выявлять дефекты цитоскелета эритроцитов как биологической основы патогенеза наследственного сфероцитоза. Исследовано 60 образцов периферической крови взрослых и 17 детей с доказанным отсутствием гематологических нарушений и образцы периферической крови 11 пациентов с верифицированным наследственным сфероцитозом. Методом проточной цитометрии проведена регистрация средней интенсивности флуоресценции э5м. Снижение СИФ э5м эритроцитов больных НС по сравнению с данными групп сопоставления отмечено во всех случаях. Различия СИФ э5м больных сфероцитозом и представителей групп сопоставления достоверны ($p < 0,05$). Длительность проведения исследования не превышает двух-трех часов. Условием успешной стандартной регистрации сигнала флуоресценции является соблюдение правил надлежащей лабораторной практики. Введение высокочувствительного и специфичного диагностического теста на определение дефицита мембранных белков эритроцитов в лабораторную практику поможет верифицировать диагноз наследственный сфероцитоз.

Ключевые слова: наследственный сфероцитоз, цитоскелет, метод связывания флуоресцентного красителя, метод проточной цитометрии, дефицит мембранных белков эритроцитов.

EARLY DIAGNOSIS OF HEREDITARY SPHEROCYTOSIS AND PREVENTION OF FACIAL SKELETON DEVELOPMENT

JU.A. PROCHOROVA*, N.E. SOKOLOVA**, E.E. ZUEVA*

* State budget educational institution of higher professional education “St. Petersburg Pavlov State Medical University”, Ministry of Health Care and social development; St. Petersburg, Russia

** State Institution of Health Care «Pediatric Municipal Hospital N 1», Saint-Petersburg

Summary. One of the main causes of hereditary hemolytic anemias is the complete or partial loss of one or several red blood cells cytoskeletal proteins. Hereditary spherocytosis is one of the most common RBC membranopathies with prevalence 1 case for 10 000 of adult population or 1 case for 2–5 thousand of newborns. This condition can be revealed in most of ethnic groups. Hereditary spherocytosis is due to the disturbances in the vertical links in cytoskeleton caused by ankyrin, spectrin, band 3 protein and some other proteins which link the cytoskeleton to cellular membrane. Method of linking of fluorescent stain eosin-5-meleimid (e5m) to lysine-430 of the first extracellular loop of band 3 protein is used since 2000. It gives possibility to reveal the RBC cytoskeleton defects. We investigated 60 peripheral blood samples taken from adults and 17 ones — from children without hematological diseases. Second group included 11 patients with verified hereditary spherocytosis. Flow cytometry method was used with registration of median intensity of fluorescence for e5m. Decrease of immunofluorescence of e5m of RBC in patients with hereditary spherocytosis was revealed in all cases. Significant difference was revealed in all cases ($p < 0,05$). Duration of the investigation is not exceeding 2–3 hours. Conditions for successful standard registration of fluorescence signal are those of the usual laboratory practice. This highly sensitive and specific diagnostic test for determination of RBC membrane proteins deficiency can help verification of hereditary spherocytosis.

Key words: hereditary spherocytosis, cytoskeleton, method of fluorescent stain binding, flow cytometry method, deficiency of membrane proteins in RBC.

Данные для корреспонденции:

Прохорова Юлия Александровна, лаборатория клинической иммунологии и молекулярной диагностики Центра лабораторной диагностики СПбГМУ им. И.П. Павлова; 197022, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, 6/8, тел. (812) 233-97-26, e-mail: immunology.spbgmu@gmail.com

Наследственный сфероцитоз (НС) — гемолитическая анемия, при которой красные кровяные тельца утрачивают характерную морфологию: в мазках крови наряду с нормальными двояковогнутыми эритроцитами у больных НС часто присутствуют видоизмененные сферические клетки — сфероциты, возрастает соотношение клеточной поверхности к объему эритроцита. Причина морфологических изменений эритроцитов состоит в ослаблении вертикальных связей цитоскелета [1].

За время жизни в процессе циркуляции в кровеносном русле эритроцит проходит через узкие капилляры в среднем 100 000 раз. В норме высокая прочность и эластичность красных кровяных телец обеспечена сетью ассоциированного с мембраной цитоскелета [2].

Цитоскелет эритроцита представляет собой белковую сеть, образованную спектрином, анкирином и белком полосы 4.1, расположенную с внутриклеточной стороны мембраны и прочно закоренную в ней вертикальными связями (рис. 1). Принципиально важное звено в образовании вертикальных связей цитоскелета — интегральный белок полосы 3, молекула которого состоит из трех неравнозначных доменов. N-терминальный цитоплазматический домен связан с периферическими мембранными и цитоплазматическими белками, такими как анкирин, белок полосы 4.2, гемоглобин. Гидрофобный трансмембранный домен формирует комплекс с другими интегральными протеинами, такими как RH-ассоциированные белки. C-терминальный домен имеет участок для связывания карбоангидразы II. Дру-

гая точка закоривания цитоскелета в липидном бислое мембраны — гликофорин С, взаимодействующий с белком полосы 4.1. Гликофорин А также частично ассоциирован с белком полосы 3 [3].

Молекулярные дефекты, ведущие к изменениям в структуре цитоскелета при НС гетерогенны:

- в ряде случаев имеет место частичный дефект α -спектрина (рецессивно-наследуемый НС: мутация локализуется в области α -спектрина);
- доминантно-наследуемый НС: мутация локализуется в конверсируемой области β -спектрина;
- комбинированный дефект спектрина и анкирина (потеря или снижение экспрессии генов анкирина или пропорциональное снижение содержания спектрина) — наиболее распространенный вариант, обнаруживают в 40–65% случаев НС в северо-европейской популяции;
- частичный дефект цепи протеина 3 (доминантно-наследуемое заболевание);
- дефицит протеина 4.2 и другие дефекты [4].

У пациентов с НС нормальные двояковогнутые эритроциты с дефицитом одного или нескольких белков в структуре цитоскелета при прохождении через селезенку утрачивают часть мембраны и превращаются в ригидные сферические клетки. Время жизни сфероцитов составляет всего 14–20 дней, тогда как нормальные эритроциты циркулируют в кровотоке до 120 дней [5]. С раннего детства существующий гемолиз сопровождается гиперплазией костного мозга, что в свою очередь ведет к на-

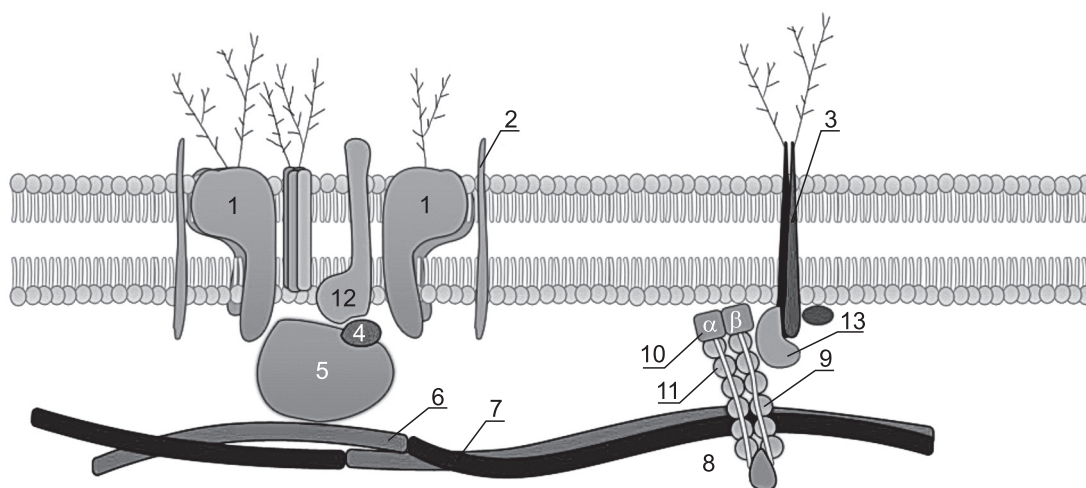


Рис. 1. Мембрана эритроцита. Вертикальные и горизонтальные связи между белками цитоскелета.

Расположение белков относительно друг друга соответствует действительности, но белки и липиды изображены без соблюдения масштаба. Обозначения: 1 — белок полосы 3; 2 — гликофорин А; 3 — гликофорин С; 4 — белок полосы 4.2; 5 — анкирин; 6 — α -спектрин; 7 — β -спектрин; 8 — тропомодулин; 9 — актиновый протофиламент; 10 — аддуцин; 11 — тропомиозин; 12 — CD47; 13 — белок полосы 4.1

рушению формирования костей. У больных отмечаются деформация челюстей с неправильным расположением зубов, высокое небо, выступающий лоб, небольшое пучеглазие. Клинические признаки — желтуха, увеличение селезенки, сфероцитоз эритроцитов, высокий ретикулоцитоз, деформация лицевого скелета — делают диагноз наследственного сфероцитоза несомненным. Как правило, аналогичные признаки можно обнаружить у одного из родителей больного, хотя они могут быть выражены в разной степени. В редких случаях родители оказываются совершенно здоровыми. Трудности диагностики часто обусловлены картиной желчнокаменной болезни, которая обычно сопровождает НС из-за образования в протоках и желчном пузыре билирубиновых камней, развивается механическая желтуха и свойственная гемолизу непрямого билирубинемия сменяется прямой. Сфероцитоз эритроцитов и другие признаки гемолиза могут быть выявлены и при аутоиммунных гемолитических анемиях, однако они не влекут за собой изменений лицевого скелета, при первых клинических проявлениях еще не отмечается существенного увеличения селезенки и болезненности в области желчного пузыря. Радикальный метод лечения НС — спленэктомия, показана при выраженном гемолизе, анемии, желчнокаменной болезни, наличии трофических язв голени. У детей спленэктомию желательнее проводить после 7–8-летнего возраста, однако гемолитические кризы являются прямым показанием к операции в любом возрасте. После удаления селезенки наступает практическое выздоровление у всех больных, сфероцитоз эритроцитов и небольшие признаки повышенного гемолиза по-прежнему присутствуют. Спленэктомия существенно увеличивает срок жизни эритроцитов и нормализует уровень гемоглобина. В 75% случаев наследственный сфероцитоз наследуется по аутосомальному доминантному типу и в 25% представляет собой уникальные мутации.

Верификацию диагноза НС при наличии семейной истории и клинических проявлений у пациента проводят с помощью традиционных диагностических тестов — оценки осмотической хрупкости эритроцитов и определения в мазке крови морфологически различных типов эритроцитов с учетом показателей клинического анализа крови [6]. Характерным признаком НС является снижение минимальной осмотической резистентности эритроцитов. В норме эритроциты сохраняют свою форму в гипосмолярном растворе NaCl (0,44–0,48% NaCl), при НС гемолиз начинается при 0,6–0,7% NaCl. Для подтверждения диагноза важно значительное понижение минимальной осмотической резистентности [7]. Диагностическая информативность теста на осмотическую стойкость не абсолютная, так как среди больных НС встречаются лица, у которых, несмотря на явный сфероцитоз, осмотическая стойкость эритроцитов сохранена. Результаты пробы на осмотическую хрупкость могут быть ложно-положительными у беременных женщин, при патологии почек и некоторых других состояниях

[8]. Таким образом, метод определения осмотической резистентности эритроцитов недостаточно чувствителен для верификации заболевания, труден для стандартизации и не обеспечен необходимым контрольным материалом.

В 20–30% случаев НС болезнь протекает бессимптомно, со средней степенью спленомегалии, легким ретикулоцитозом, без выраженной анемии, продукция эритроцитов эквивалентна их убыли в результате гемолиза, что значительно затрудняет диагностику. У детей первого года жизни диагностика сфероцитоза затруднена в силу возрастных особенностей гемопоэза (возрастной макроцитоз). Изменения расчетных показателей клинического анализа крови (MHC, MCV, MHCN) неспецифичны для НС. Ретикулоцитоз отмечают практически в 99% случаев. Генетический анализ как диагностическое исследование затруднителен, поскольку мутации, определяющие заболевание, уникальны.

Метод проточной цитофлуориметрии относят к золотым стандартам клинической лабораторной диагностики, тем не менее, проточная цитометрия не применяется рутинно в верификации мембранопатий эритроцитов. Метод связывания эозин-5 малеимида с белками цитоскелета эритроцитов позволяет выявлять дефекты цитоскелета мембраны эритроцита в разных возрастных группах, в том числе, у новорожденных детей [9, 10, 11, 12]. Белок полосы 3, с которым связывается основная масса молекул эозин-5 малеимида, Cl⁻/HCO₃⁻-транспортер и наиболее распространенный белок в составе мембран эритроцитов, тесно связан со спектриновой сетью, которая формирует гибкий цитоскелет эритроцитов [3].

Материалы и методы исследования

1. Пациенты

В исследование включены пациенты с подтвержденным диагнозом наследственного сфероцитоза — 19 человек: дети обоих полов в возрасте от 4 месяцев до 14 лет, в том числе 5 детей первого года жизни и 3 взрослых мужчин, перенесших спленэктомию. Верификация диагноза была проведена на основе клинических проявлений, семейной истории, исследования мазков крови, клинического анализа крови и теста на осмотическую хрупкость эритроцитов. Для сопоставления включены две группы пациентов с доказанным отсутствием гематологических заболеваний: взрослые — 125 человек (мужчины и женщины в возрасте от 21 до 74 лет; медиана 46 лет) и дети — 18 человек (возраст от 3 месяцев до 17 лет), в том числе 4 ребенка первого года жизни.

2. Материал и методы исследования

Забор периферической венозной крови проводили в вакуумные пробирки с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА). Клеточным маркером в исследовании стали мембранные белки эритроцитов (белок поло-

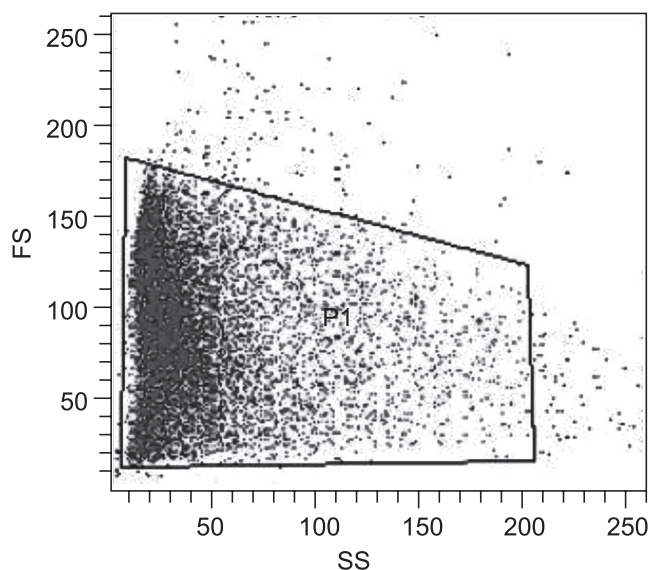


Рис. 2. Гейтирование эритроцитов для определения параметра СИФ э5м

сы 3, спектрин, анкирин, белок полосы 4.2). Для выявления сохранности эритроцитарного цитоскелета применяли краситель эозин-5 малеимид (eosin-5 maleimide, Sigma, США), который ковалентно связывается с лизин-430 белка полосы 3 в составе мембран эритроцитов. Подготовка образцов крови к исследованию включала отмывку эритроцитов в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) pH 7,0 при 1000 об/мин., инкубирование с красителем э5м в темноте при комнатной температуре в течение 60 мин, отмывку от несвязавшегося красителя ФСБ pH 7,0 при 1000 об/мин в течение 10 минут и удаление надосадка. В каждой аналитической серии СИФ э5м пациента с подозрением на НС была сопоставлена с аналогичным показателем шести человек с доказанным отсутствием гематологических заболеваний. Сбор данных проведен на проточном цитометре FC500 (Beckman Coulter). Анализ СИФ э5м проведен с использованием программы CXAnalysis (Beckman Coulter) по данным 10 000 эритроцитов, гейтированных по параметрам светорассеяния (рис. 2). Для оценки нормальности выборок, непараметрического анализа, построения графиков описательной статистики использованы программы Statistica (версия 7.0 для Windows). ROC-анализ выполнен с использованием программы MedCalc (версия 7.4.4.1 для Windows).

Результаты

Получены данные по средней интенсивности флуоресценции (СИФ) эозин-5 малеимида (э5м) эритроцитов пациентов с верифицированным диагнозом наследственного сфероцитоза и групп сопоставления (рис. 3).

Интенсивность флуоресценции э5м образцов крови больных наследственным сфероцитозом составила

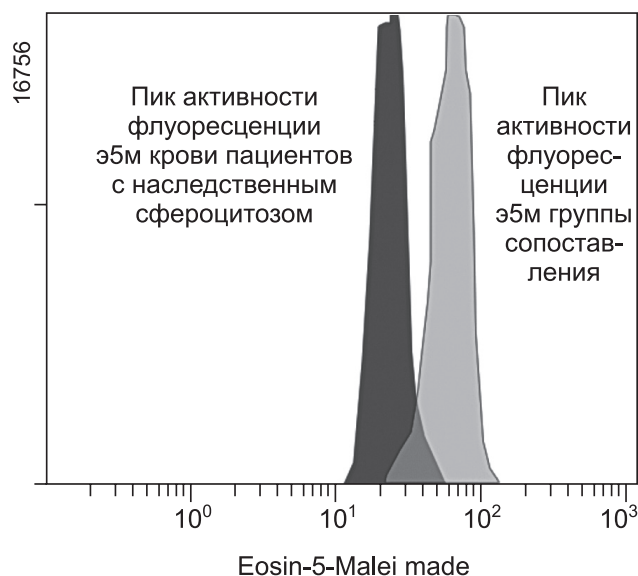


Рис. 3. Гистограмма интенсивности флуоресценции э5м эритроцитов больного НС и группы сопоставления. Интенсивность экспрессии э5м группы сопоставления обозначена серым цветом, больного НС — черным

$20,2 \pm 1,2$ у.е. Исключением стал результат, полученный для образцов крови двух взрослых пациентов с НС с проведенной спленэктомией — 25 и 25,9 у.е. флуоресценции. СИФ э5м обеих групп сопоставления (взрослые и дети) была практически одинаковой и составила 31 ± 4 у.е. (рис. 4). Достоверные различия между группами сопоставления по критерию Манна–Уитни не выявлены ($U = 476, z = 0,75, p = 0,45$). С практической точки зрения это означает, что для сопоставления допустимо использование крови доноров с доказанным отсутствием гематологических отклонений вне зависимости от их возраста.

При статистическом анализе выявлено, что распределение по Гауссу выборки пациентов с НС не соответствует нормальному (рис. 5). Для оценки достоверности различий СИФ э5м больных НС ($n = 19$) и группы сопоставления ($n = 125$) использован непараметрический критерий Манна–Уитни: $U = 0, Z = 7,00, p < 0,05$, различия достоверны. При построении ROC-кривой оптимальная точка отсечки показателя СИФ э5м составила 25,9 единицы флуоресценции, площадь под кривой = 1 (рис. 6). ROC-кривая показывает зависимость количества верно классифицированных положительных примеров от количества неверно классифицированных отрицательных примеров.

По результатам проведенного исследования специфичность теста на связывание э5м составила 100%, чувствительность — 100%. Высокий уровень специфичности и чувствительности в нашем исследовании, вероятно, связан с однородностью группы больных НС. Не исключено, что расширение группы пациентов за счет пациентов с менее четкой клинической картиной приведет к изменению значений специфичности и чувствительности.

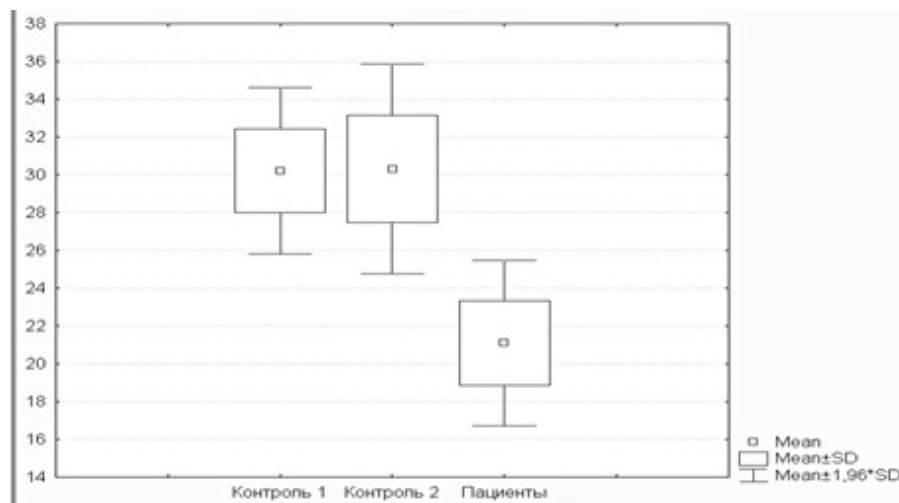


Рис. 4. СИФ э5м больных НС и групп сопоставления.
Группа сопоставления взрослого возраста — контроль 1, группа сопоставления детского возраста — контроль 2

Обсуждение

Эозин-5 малеймид используют в качестве флуоресцентного красителя для мембранных белков, поскольку 75–95% от его количества связывается с лизином-430 первой внеклеточной петли белка полосы 3 и лишь незначительная часть связывается с CD47, RH-ассоциированными белками. Снижение уровня экспрессии э5м на эритроцитах пациентов с наследственным сфероцитозом отражает дефицит мембранных белков, включая белок полосы 3, спектрин и белок полосы 4.2 [8].

Выявленное снижение показателя средней интенсивности флуоресценции э5м эритроцитов у пациентов с НС Санкт-Петербурга (в среднем на 34,8% относительно СИФ э5м группы сопоставления) не противоречит результатам предшествовавших исследований.

Для стандартизации оценки результатов исследования СИФ э5м в нашей лаборатории введен коэффициент S:

$$S = \frac{\text{СИФ э5м пациента}}{\sum \text{СИФ э5м 6 образцов группы контроля}}$$

Установлена точка отсечки по значению расчетного коэффициента S здоровых людей:

$$S \geq 0,8.$$

При исследовании эритроцитов взрослых пациентов с ранее проведенной спленэктомией у двоих из них выявлен более высокий показатель СИФ Э5М (25 и 25,9 условных единиц, снижение на 19,5% относительно группы контроля), по сравнению с показателем других пациентов с наследственным сфероцитозом [13]. Относительно высокий показатель СИФ э5м в данных случаях, вероятно, объясняется тем, что генетически обусловленный дефицит мембранных белков у пациентов не усугублялся повреждающим

воздействием селезенки на эритроциты вследствие ранее проведенной спленэктомии.

Высокотехнологичный метод проточной цитометрии позволяет выявлять сохранность структуры цитоскелета эритроцитов, открывает новое направление диагностических исследований.

Сложности обсуждаемого диагностического подхода носят, в основном, организационный характер:

- краситель э5м неустойчив в разведенной форме, раствор требует хранения при -70°C ;
- необходимо использовать шесть контрольных образцов для формирования группы сопоставления при оценке каждого образца крови, направленного на исследование в связи с подозрением на НС;

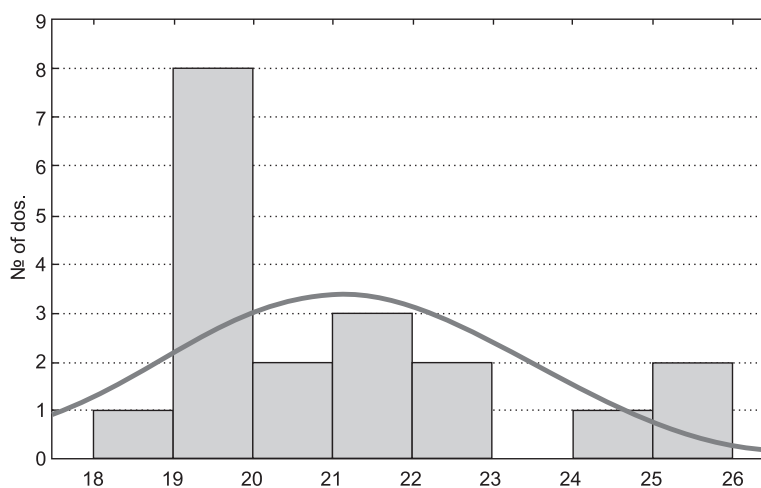


Рис. 5. Распределение выборки пациентов с наследственным сфероцитозом по СИФ э5м.
По горизонтали — СИФ (усл. ед), по вертикали — количество случаев. Красная сплошная линия отражает гауссовское (нормальное) распределение

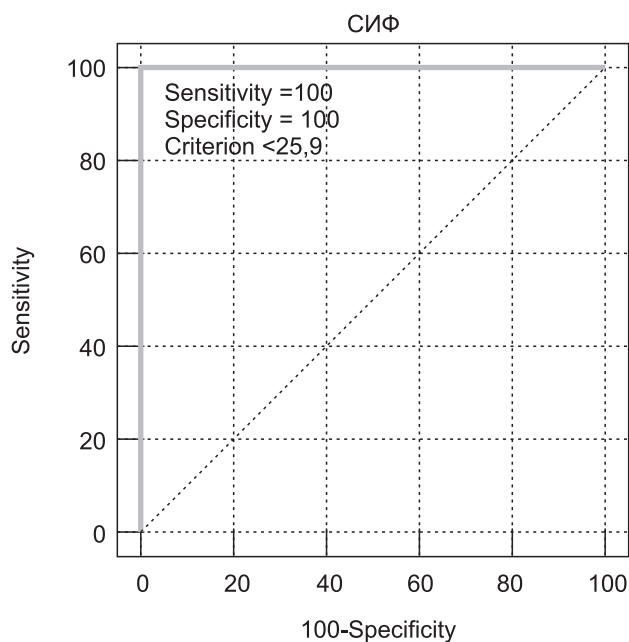


Рис. 6. ROC-кривая для определения специфичности и чувствительности теста на связывание э5м

— отсутствует контрольный материал и программы внешней оценки качества.

Несомненными плюсами нового диагностического подхода являются:

- возможность диагностики НС у пациентов без семейной истории;
- высокая специфичность и чувствительность теста;
- возможность выявления дефекта мембраны эритроцитов при диагностике наследственного сфероцитоза у детей до года.

Результаты проточной цитометрии эритроцитов, окрашенных э5м, свидетельствуют о потенциально широких возможностях применения метода связывания эозин-5 малеимида мембранными белками эритроцитов для уточнения диагноза наследственного сфероцитоза. Применение метода проточной цитометрии для ранней диагностики НС и своевременная врачебная помощь по-

зволят снизить риски развития гиперплазии костного мозга, минимизировать проявления нарушения костеобразования, повысить качество жизни пациентов.

Литература

1. Радченко В.Г. Основы клинической гематологии. СПб.: Диалект, 2003: 304.
2. An X., Mohandas N. Disorders of red cell membrane. Br. J. Haematol. 2008; 141: 367–375.
3. Doherty G.J., McMahon H.T. Mediation, modulation and consequences of membrane-cytoskeleton interactions. Annual Review of Biophysics. 2008; 37: 73.
4. Agre P., Orringer E.P., Bennett V. Deficient red-cell spectrin in severe, recessively inherited spherocytosis. N. Engl. J. Med. 1982; 306: 1155–1161.
5. Kern W.F. PDQ Hematology, PMPH USA. Hereditary Spherocytosis. 2002: 110.
6. Гусева С.А., Вознюк В.П., Дубкова А.Г. Анемии: принципы диагностики и лечения / Под ред. С.А. Гусевой. Киев, 1999: 74–75.
7. Discher D.E., Carl P. New insights into red cell network structure, elasticity, and spectrin unfolding: a current review. Cell. Mol. Biol. Lett. 2001; 6: 593–606.
8. King M.J., Smythe J.S., Mushens R. Eosin-5-maleimide binding to band 3 and Rh-related proteins forms the basis of a screening test for hereditary spherocytosis. Br. J. Haematology. 2004; 124: 106–113.
9. Cobb C.E., Beth A.H. Identification of the eosin-5 maleimide reaction site on the human erythrocyte anion-exchange protein: overlap with the reaction sites of other chemical probes. Biochemistry. 1990; 29: 8283–8290.
10. Gallagher P., Lux S. Disorders of the erythrocyte membrane. In: Nathan D., Orkin S., eds. Nathan and Oski's hematology of infancy and childhood. Philadelphia: Elsevier-Saunders, 2003: 560–684.
11. King M.J., Behrens J., Rogers C. et al. Rapid flow cytometric test for the diagnosis of membrane cytoskeleton-associated haemolytic anemia. Br. J. Haematol. 2000; 111: 924–933.
12. King M.J., Jepson M.A., Guest A., Mushens R. Detection of hereditary pyropoikilocytosis by the eosin-5 maleimide (EMA)-binding test is attributable to a marked reduction in EMA-reactive transmembrane proteins. Int. Journal of Laboratory Hematology. 2011; 33: 205–211.
13. Прохорова Ю.А., Зуева Е.Е., Соколова Н.Е. Проточная цитометрия в диагностике наследственного сфероцитоза. Сборник материалов Межрегиональной научно-практической конференции: «Диагностика и лечение анемий в XXI веке». Рязань, 2011: 13.

КРИСТАЛЛОГРАФИЧЕСКИЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ СЛЮНЫ

Н.А. Колтовой
ЦП ОАО РЖД,
8-916-379-96-63, koltovoi@mail.ru

CRISTALLOGRAPHIC METHOD OF SALIVA INVESTIGATION

N.A. Koltovoy
Central Out-patient department of Russian Railways

Рассматривается применение кристаллографического метода исследования слюны для оценки состояния организма и диагностики различных заболеваний. Различные типы образовавшихся структур и кристаллов отражают состав и свойства слюны, состояние организма.

Существуют две модификации метода:

- метод открытой кристаллизации. На предметное стекло наносится капля слюны и высушивается.
- метод закрытой кристаллизации. Капля слюны помещается на предметное стекло и накрывается покровным стеклом. При испарении воды происходит кристаллизация различных компонент слюны.

Метод кристаллизации позволяет проводить диагностику следующих заболеваний:

- воспаление тканей пародонта,
- кариес,
- воспаление больших слюнных желез,
- муковисцидоз,
- хронический микобактериоз,
- адаптации к ортопедическим стоматологическим конструкциям (фаза раздражения, фаза частичного торможения, фаза полного торможения),
- болезни уха, горла, носа (холестеатома среднего уха),
- гнойно-воспалительные заболевания челюстно-лицевой области,

- профессиональная интоксикация на производстве,
- оценить гигиеническое состояние полости рта,
- язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки,
- оценивать эффективность лечения гастроэнтерологических патологий,
- определить благоприятные для зачатия ребенка дни, в период овуляции в высушенной слюне появляются структуры типа листа папоротника.

Преимущества метода кристаллизации:

- низкая стоимость исследования (нет необходимости в использовании дорогостоящих реактивов и расходных материалов),
- простота и доступность метода (нет необходимости в использовании дорогостоящего оборудования, достаточно наличие обычного микроскопа),
- нет необходимости в привлечении высококвалифицированных специалистов,
- оперативность метода,
- возможность применения метода при массовых обследованиях.

Выводы: преимущества метода кристаллизации и его высокие диагностические возможности позволят применять его для выявления заболеваний на ранних стадиях и повысить эффективность лечения.

ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНОЕ ИЗМЕРЕНИЕ КАРДИАЛЬНЫХ ТРОПОНИНОВ: ТЕСТ, КОТОРЫЙ СПАСАЕТ ЖИЗНИ

В.В. ВЕЛЬКОВ

ЗАО «ДИАКОН», г. Пушкино, Московская область

Резюме. Краткий обзор научной информации, касающейся проблем, связанных с высокочувствительным измерением кардиальных тропонинов, с интерпретацией получаемых результатов и, в особенности, с трудностями стандартизации соответствующих диагностических наборов, предлагаемых различными производителями. Особое внимание уделено двум проблемам. Первая состоит в том, что различные производители для повышения чувствительности используют в диагностических наборах большое количество различных моноклональных антител, узнающих различные тропониновые эпитопы. Это приводит к тому, что различные производители рекомендуют для своих наборов собственные референтные нормальные и патологические уровни, не совпадающие с таковыми, рекомендуемыми другими производителями. В настоящее время это не позволяет сравнивать между собой результаты измерений, проведенных в одном и том же образце с помощью тестов различных производителей. Вторая трудность: при развитии ишемии у разных пациентов может быть различный спектр эпитопов как индивидуальных тропонинов, так и их комплексов, что может влиять на точность теста. Тем не менее, несмотря на эти проблемы, внедрение высокочувствительных тропонинов приводит к высокой частоте смены диагнозов «нестабильная стенокардия» на диагноз ИМ без элевации ST сегмента, что при проведении адекватного вмешательства снижает неблагоприятные исходы в 1,9–2,6 раза.

Ключевые слова: кардиальные тропонины, высокочувствительное измерение, стандартизация тестов, ранняя диагностика ИМ Б ST.

HIGH SENSITIVE MEASUREMENT OF CARDIAC TROPONINS: TEST WHICH SAVES LIVES

V.V. VELKOV

«Diakon» Company, Pushino, Moscow district

Summary. The article presents the review of scientific publications concerning the high sensitive measurement of cardiac troponins, interpretation of the results, difficulties of standartization of the diagnostic kits, proposed by different companies. Special attention is paid to two problems. One concerns the fact that different companies are using the diagnostic kits with large number of monoclonal antibodies recognizing different troponin epitopes. That's why every company recommends its own reference and pathological intervals, which differ from the intervals given by other companies. That's why the results measured by different test kits in the same sample can't be compared. Another difficulties are related to the fact, that in development of ischemia in different individuals may lead to different epitopes spectrum in troponins and their complexes. This also can influence the sensitivity of the test. However, in spite of all these problems, the introduction of highly sensitive troponin test leads the improvement of IM diagnosis. Introduction of these tests gives possibility to change the diagnosis "unstable angina" to "MI without ST elevation" (NSTEMI) in large number of patients. Thus, adequate treatment can be performed more early, which may 1,9–2,6 times decrease the rate of the unfavorable outcomes.

Key words: cardiac troponins, high sensitive measurement, standards of measurements, early NSTEMI diagnosis.

Данные для корреспонденции:

Вельков Василий Васильевич, к. б. н.,
директор по науке ЗАО «ДИАКОН»,
142290, Московская обл., г. Пушкино, пр. Науки, 5,
тел.: (905) 501-82-05, e-mail: vvv@diakonlab.ru

Есть ли у тропонинов нормальные значения?

Чувствительность и специфичность диагностических наборов предполагает, что нормальный уровень анализа должен соответствовать таковому при 99-й перцентили. 99-я перцентиль — это уровень анализа, при котором 99 из 100 лиц здоровой популяции будут иметь отрицательный результат тестирования (только 1 из 100 может иметь ложноположительный результат).

Универсальное определение инфаркта миокарда (ИМ) устанавливает как один из его главных диагностических критериев «...повышение и/или снижение кардиальных тропонинов по крайней мере выше одного значения уровня, **характерного для 99-й перцентили здоровой популяции**» [1].

Однако, как известно, «обычные» тропониновые тесты из-за своей низкой чувствительности вообще не определяют тропонины у здоровых лиц, что и привело, как только недавно выяснилось, к распространенному заблуждению, что «в норме тропонинов нет» и что все здоровые лица — «тропонин-отрицательны». При этом упускалось из виду, что универсальное определение ИМ требовало измерения практически неизмеряемого значения — нормального уровня кардиальных тропонинов. Проблема была решена в конце «нулевых».

Высокочувствительные тропониновые тесты, hs-cTn (hs, high sensitive — высокочувствительный), определяют очень низкие концентрации тропонинов, начинающиеся от 1,0 нг/л (0,001 нг/мл) и находящиеся ниже значения, соответствующего 99-й перцентили. Точность при этом также высокая — CV < 10%. В итоге, кардиальные тропонины стали обнаруживаться почти у всех здоровых людей [обзоры 2–5]. Действительно, «тропонин-отрицательных» больше нет.

Многочисленные исследования показали, что:

- 1) нормальные уровни кардиальных тропонинов составляют 2–5 нг/л (0,002–0,005 нг/мл);
- 2) пограничный уровень, соответствующий 99-й перцентили, для конкретного диагностического набора и его платформы зависит от производителя и имеет собственное значение. Так, пограничный уровень теста hs-cTnT Roche — 14 нг/л, а теста hs-cTnI PATHFAST Mitsubichi — 20 нг/л. Проблемы, связанные с трудностями стандартизации различных hs-cTn тестов и с невозможностью сравнения их результатов, будут рассмотрены ниже;
- 3) уровни hs-cTn должны интерпретироваться как **количественные** переменные, терминов «тропонин-отрицательный» и «тропонин-положительный» следует избегать;
- 4) в общей популяции значения hs-cTn тестов, слегка превышающие пограничный уровень, выявляют лиц с повышенным риском *структурных* заболеваний миокарда и риском смертности от всех причин;

- 5) короткий период ишемии, не связанный с явным ИМ, вызывает высвобождение в кровотоки небольшого количества hs-cTn;
- 6) при стабильных заболеваниях коронарных артерий повышенные уровни hs-cTn связаны с риском сердечно-сосудистой смерти и сердечной недостаточности, но не с риском ИМ;
- 7) у пациентов с симптомами острого коронарного синдрома (ОКС) hs-cTn — это ранний маркер ИМ, который, по сравнению с «обычными» cTn тестами, выявляет большее количество пациентов с диагнозом ИМ Б ST (ИМ без элевации ST сегмента) и является независимым предиктором неблагоприятных исходов;
- 8) динамика уровней hs-cTn (повышение, постоянство, снижение концентрации в крови) дифференцирует острый некроз кардиомиоцитов от их хронического повреждения;
- 9) с помощью серийного измерения hs-cTn диагноз ИМ можно исключить уже в первые часы после поступления;
- 10) повышенные уровни hs-cTn могут быть связаны и с неишемическими причинами, которые следует устанавливать;
- 11) вне зависимости от того, вызвано ли повышение hs-cTn ишемическими или другими причинами, во всех случаях повышенный hs-cTn — предиктор неблагоприятных исходов, включающих: повторные ОКС, фатальные и не фатальные ИМ и смертность от всех причин [2–5].

Нормальные уровни тропонинов — откуда и почему?

Полагается, что в норме причины выхода тропонинов в кровотоки могут быть таковы [5–7]:

- 1) *Маломасштабный некроз миоцитов.* Это наиболее распространенный процесс, который может вызываться ишемическим или воспалительным состоянием, прямой травмой и токсическими причинами, включая сепсис.
- 2) *Апоптоз, или запрограммированная смерть клеток.* Апоптоз на фоне сохраненной целостности клеточных мембран связан с активацией каспаз, вызывающих деградацию структурных белков миокарда, что может приводить к высвобождению тропонинов в кровотоки.
- 3) *Нормальный метаболизм миоцитов.* В целом, на протяжении жизни обновлению подвергаются около 50% кардиомиоцитов. Пока неясно, связан ли процесс обновления миоцитов с высвобождением тропонинов в кровотоки.
- 4) *Высвобождение продуктов протеолитической деградации тропонинов из миоцитов.* Предполагается, что такой процесс может происходить без гибели миоцитов и без нарушения целостности клеточных мембран. В результате протеолиза образуются мелкие фрагменты тропонинов, кото-

рые проходят через неповрежденные клеточные мембраны.

- 5) *Повышенная проницаемость клеточных стенок.* Обратимое повреждение мембран кардиомиоцитов при напряжении миокарда или при ишемии позволяет тропонинам цитозоля выходить в кровотоки.
- 6) *Образование и высвобождение мембранных везикул.* Подобный механизм обнаружен при ишемии у клеток печени, когда большие молекулы могут выходить из внутриклеточного пространства во внеклеточное без некроза гепатоцитов [5–7].

Выход тропонинов в кровотоки при ишемии, но без миоинфаркта

О том, что кардиомаркеры могут выходить в кровотоки и без некроза клеток, известно с 1971 г., когда в модельных экспериментах было обнаружено, что при повреждении сердечной ткани лактатдегидрогеназа может высвобождаться в кровотоки и в отсутствие погибших клеток [8].

Аналогичные результаты были получены и с креатинкиназой (КК) и креатинкиназой МБ (КК МБ). Короткий период коронарной окклюзии, вызывающий кратковременную ишемию, недостаточную для того, чтобы вызвать повреждение миокарда, приводил к выходу этих ферментов в кровотоки [9]. Согласно ранним представлениям, повреждения миоцитов необратимы, их регенерация невозможна. И, как полагалось, если происходит выход в кровотоки кардиомаркеров, свидетельствующих о необратимом повреждении, со временем эта прогрессирующая необратимость обязательно приведет к усилению тяжести патологии. Опасения оказались напрасными. Кардиомиоциты способны к регенерации и к восстановлению функций поврежденного сердца [10].

Особо отметим, что выход тропонинов наблюдается при интенсивных физических нагрузках, после марафонских забегов и при стресс-тестах. Повышенные после марафонского забега тропонины приходят в норму через 72 ч [5, 11].

Как тропонины выходят в кровотоки при ОКС?

Тропонин в миоцитах состоит из двух пулов — структурного, когда находится в миофибриллах, и цитозольного — когда находится в свободном от миофибрилл состоянии и в комплексе с другими тропонинами. Именно цитозольный пул и выходит в кровотоки при раннем развитии повреждений миокарда. hs-cTn тесты фиксируют именно этот ранний выход цитозольных тропонинов в кровотоки и отражают динамику этого процесса.

Следующий и относительно длительный выход тропонинов из разрушенных миофибрилл, из структурного пула, связан с более серьезными повреждениями миокарда, которые чем тяжелее — тем более необратимы. «Постулировано, что выход тропонинов из структурно-

го пула — это синоним клеточной смерти, а выход тропонинов из цитозольного пула может быть связан как с обратимыми, так и с необратимыми повреждениями» [6].

Циркулирующие тропонины — анализ «с тысячами лиц»

Многолетние исследования показывают, что при ОИМ cTnI циркулирует в кровотоке: а) как свободный cTnI, б) как бинарный комплекс cTnI-cTnC и в) как тройной комплекс cTnI-cTnC-cTnT. Более того, в крови присутствуют продукты: г) N-терминальной деградации cTnI, а также д) фосфорилированные и ж) окисленные производные как свободного cTnI, так и его и) двойных и к) тройных комплексов. При этом у разных пациентов соотношение концентраций всех этих форм cTnI и его комплексов индивидуальное. И, похоже, при развитии ОИМ соотношение концентраций этих форм может меняться [12–15].

Количественное определение тропонинов базируется на моноклональных антителах, узнающих различные эпитопы. Таких эпитопов может быть весьма много. Более того, у разных пациентов они могут разными, а у одного и того же пациента соотношение этих эпитопов может меняться в течение развития ОКС и, не исключено, может быть различным при повторных ОКС. Кроме того, могут быть эпитопы, чья эффективность может зависеть от гепарина, от наличия гетерофильных антител, от связывания аутоантител [16–18].

Таким образом, «в лице тропонина» мы имеем анализ «с тысячами лиц», выражение которых может меняться от пациента к пациенту и «от часа к часу» [13].

Такая эпитопная вариабельность и динамичность гетерогенной популяции циркулирующих тропонинов приводит к тому, что различные производители тропониновых тестов, чтобы улучшить их чувствительность, включают в тест все большее количество различных антител. В итоге, тесты различных производителей имеют: а) разные показатели чувствительности, б) разные значения 99-й перцентили и в) разные значения диагностических уровней. Некоторые hs-cTnI тесты показывают, что нормальные уровни тропонина у мужчин и женщин — разные, другие такой разницы «не видят». Полагается, что «для диабетиков и для пожилых лиц должны быть отдельные пограничные уровни hs-cTn тестов, и более того, разные для тестов различных производителей» [19, 20].

В целом, «все эти данные показывают, что сравнение абсолютных концентраций тропонинов, полученных с помощью тестов различных производителей, невозможно» [20].

Но, может быть, возможна международная стандартизация hs-cTn тестов? Например, с помощью референтных материалов, утвержденных международным сообществом экспертов? На этот счет есть две точки зрения: сдержанно оптимистическая и реалистическая. Сдер-

жанно оптимистической придерживается рабочая группа Международной федерации клинической химии (IFCC) по стандартизации кардиального тропонина I, считающая, что такая стандартизация возможна. Статья, опубликованная от имени этой группы, так и называется: «Отнеситесь к этому просто: стандартизация кардиального тропонина I сложна» [21]. Реалистическая точка зрения приведена в статье, расположенной рядом: «Стандартизация определения кардиального тропонина I: при моей жизни этого не случится» [20].

Кроме причин, приведенных выше (гетерогенность и непостоянство популяции изоформ cTnI и его комплексов), приводятся данные и о том, что даже в тех случаях, когда производитель применяет тесты с идентичными антителами, но на разных платформах, результаты измерений не совпадают [20].

Плата за высокую чувствительность

Плата за высокую чувствительность — компромисс между несомненной пользой выявления ИМ в самые первые часы и тем, что наблюдаемое повышение hs-cTn может быть вызвано не ИМ, а, например, неишемическим некрозом кардиомиоцитов, который, в свою очередь, может быть связан с большим количеством других патологий [22–28].

Уж не проще ли использовать традиционно высокие пограничные уровни тропонинов, имеющие большую специфичность по отношению к ОИМ? Однако такой подход, *«хотя и делает жизнь кардиологов легкой, но подвергает опасности жизнь пациентов с ранними ОИМ или с другими случаями некроза миоцитов, которые при традиционных пограничных уровнях cTn останутся незамеченными»* [29].

Серийные измерения hs-cTn повышают специфичность

Если повышенный при первом измерении уровень hs-cTn вызван: а) стабильными заболеваниями коронарных артерий; б) хронической сердечной недостаточностью; в) нестабильной стенокардией; г) неишемическими и другими некардиальными причинами, то при измерении через 3 ч уровни hs-cTn повышаться не должны [19].

Полагается, что при серийных измерениях последовательное повышение уровня hs-cTn (выше пограничного) *четко указывает на развитие ИМ*. Постоянно повышенный hs-cTn указывает на другие причины [19].

Многочисленно показано, что диагностические алгоритмы измерения дельты (разницы концентраций) hs-cTn улучшают диагностическую специфичность, но могут: а) снижать диагностическую чувствительность и б) увеличивать время, необходимое для подтверждения или исключения диагноза ИМ [30–32].

Например, при использовании hs-cTnI теста Vitros ES cTnI измерение через 6 ч повысило диагностическую специфичность с 77 до 91%, но понизило чувствитель-

ность с 94 до 75% [30]. При использовании тестов hs-cTnT и hs-cTnI было показано, что абсолютные значения дельты (интервал измерений 2 ч) для hs-cTnT составляли 7 нг/л, а для hs cTnI — 20 нг/л и имели более высокую специфичность, чем относительные значения [32].

Аналогичные результаты, опубликованные в 2012 г., также свидетельствуют о том, что абсолютные значения дельты теста Roche hs-cTnT лучше относительных. Абсолютная дельта, составлявшая 9,2 нг/л (интервал 6 ч) дискриминировала ОКС от не-ОКС со специфичностью 90%, а относительная со специфичностью 75% [33]. Поэтому полагается, что относительное значение дельты, составляющее 20% и рекомендованное американской Национальной академией клинической биохимии [22], не является столь же эффективным, как абсолютные значения дельты, оптимизированные для конкретных hs-cTn тестов конкретных производителей [34].

В целом, «...как для лабораторий, так и для клиницистов критичным является следующее положение: конкретные абсолютные значения дельты, полученные с помощью теста Roche hs-cTnT, нельзя напрямую использовать в лаборатории, которая измеряет hs-cTn с помощью другого теста, как при использовании платформы того же самого производителя, так и другого. Важно знать, что каждый конкретный hs-cTn тест нуждается в специальном определении именно его абсолютных и относительных значений дельты» [34]. Считается, что для каждого теста абсолютные и/или относительные значения дельты должны быть определены в интервалах 0–3 ч, 3–6 ч и 0–6 ч. Это должно сократить время, необходимое для исключения ОИМ с 6 ч до 3 [34].

В целом, алгоритм серийных измерений hs-cTn «существенно смягчает главную озабоченность клиницистов, связанную с высокочувствительными тропонинами» [34].

Основная клиническая ценность hs-cTn тестов

В общем, клиническая ценность hs-cTn тестов включает их измерение: а) для выявления в общей популяции лиц с субклиническими сердечно-сосудистыми заболеваниями, б) для оценки неблагоприятных исходов при стабильных заболеваниях коронарных артерий, в) при поступлении пациентов с признаками ОКС [2–5]. Риск летальности, связанный с повышенным hs-cTnT, присутствует на всем спектре тяжести ОКС, а также при состояниях, не связанных с кардиальными причинами [35]. Учитывая, что повышенные уровни hs-cTn — предиктор неблагоприятных исходов при любых этиологиях, диагностическая ценность hs-cTn может включать и такие патологические состояния, как ХПН и ОПН, сепсис, легочная эмболия, контузии, химиотерапия, тяжелые физические нагрузки (спортивная и военная медицина) и др. состояния, при которых повышаются уровни тропонинов.

Главная клиническая ценность *hs-cTn* тестов — это значительное повышение эффективности диагностики при поступлении пациентов с клинической картиной, характерной для ОКС, при отсутствии признаков ИМ ST на ЭКГ и с *cTnI* >100 нг/л (0,1 нг/мл).

Для пациентов с указанными характеристиками *hs-cTn* это **ранний маркер развития** ИМ, который, по сравнению со «стандартным» тропониновым тестом, в течение 3–6 ч: а) исключает диагноз ИМ с вероятностью 100%, б) устанавливает диагноз ИМ Б ST с вероятностью 95% и, в целом, в) выявляет большее количество пациентов с ИМ Б ST, чем обычные *cTn* тесты [2–5, 36, 37].

«Внедрение *hs-cTn* для триажа пациентов с подозреваемым ОКС улучшит раннюю диагностику ИМ Б ST и, в конечном счете, повысит количество диагнозов ИМ Б ST и снизит количество диагнозов нестабильной стенокардии» [35].

В целом, переход от «обычных» тропониновых тестов на высокочувствительные приводит к реклассифицированию значительного процента пациентов, имевших при поступлении признаки ОКС и первичный диагноз нестабильная стенокардия, в диагноз ИМ Б ST. А это, при проведении адекватных мероприятий, снижает количество повторных ИМ в 2,6 раза, а летальность в 1,9 раза (наблюдение 1 год)» [26].

Литература

1. Thygesen K., Alpert J.S., White H.D. On behalf of the Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction. Universal definition of myocardial infarction. *Eur. Heart J.* 2007; 28: 2525–2538; *Circulation* 2007; 116: 2634–2653; *J. Am. Coll. Cardiol.* 2007; 50: 2173–2195.
2. Christenson R.H., Phillips D. Sensitive and high sensitivity next generation cardiac troponin assays: more than just a name. *Pathology.* 2011; 43 (3): 213–219.
3. Collinson P.O. Sensitive troponin assays. *J. Clin. Pathol.* 2011; 64 (10): 845–849.
4. Baker J.O., Reinhold J., Redwood S. et al. Troponins: redefining their limits. *Heart.* 2011; 97 (6): 447–452.
5. Вельков В.В. Революция в кардиологии — высокочувствительное измерение кардиальных тропонинов: «тропонин-отрицательных» больше нет. Клинико-лабораторный консилиум, 2011; 4 (40): 24–43.
6. Jaffe A.S., Wu A.H.B. Troponin Release-Reversible or Irreversible Injury? Should We Care? *Clinical Chemistry.* 2012; 58: 1148–1150.
7. Hickman P.E., Potter J.M., Aroney C. et al. Cardiac troponin may be released by ischemia alone, without necrosis. *Clin. Chim. Acta.* 2010; 411: 318–323.
8. Doty D.H., Bloor C.M., Sobel B.E. Altered tissue lactic dehydrogenase activity after exercise in the rat. *Am. J. Physiol.* 1971; 30: 548–551.
9. Heyndrickx G.R., Millard R.W., McRitchie R.J. et al. Regional myocardial functional and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in conscious dogs. *J. Clin. Invest.* 1975; 56: 978–985.
10. Anversa P., Leri A., Kajstura J. Cardiac regeneration. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2006; 47: 1769–1776.
11. Scherr J., Braun S., Schuster T. et al. 72-h kinetics of high-sensitivity troponin T and inflammatory markers after marathon. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2011; 43: 1819–1827.
12. Katrukha A.G., Bereznikova A.V., Esakova T.V. et al. Troponin I is released in bloodstream of patients with acute myocardial infarction not in free form but as complex. *Clin. Chem.* 1997; 43: 1379–1385.
13. Labugger R., Organ L., Collier C. et al. Extensive troponin I and T modification detected in serum from patients with acute myocardial infarction. *Circulation.* 2000; 102 (11): 1221–1226.
14. McDonough J.L., Van Eyk J.E. Developing the next generation of cardiac markers: disease-induced modifications of troponin I. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 2004; 47 (3): 207–216.
15. Gaze D.C., Collinson P.O. Multiple molecular forms of circulating cardiac troponin: analytical and clinical significance. *Ann. Clin. Biochem.* 2008; 45(4): 349–355.
16. Stiegler H., Fischer Y., Vazquez-Jimenez J.F. et al. Lower cardiac troponin T and I results in heparin-plasma than in serum. *Clin. Chem.* 2000; 46: 1338–1344.
17. Kim W.J., Laterza O.F., Hock K.G. et al. Performance of a revised cardiac troponin method that minimizes interferences from heterophilic antibodies. *Clin. Chem.* 2002; 48: 1028–1034.
18. Eriksson S., Halenius H., Pulkki K. et al. Negative interference in cardiac troponin I immunoassays by circulating troponin autoantibodies. *Clin. Chem.* 2005; 51: 839–847.
19. Katus H.A., Giannitsis E., Jaffe A.S. Interpreting Changes in Troponin—Clinical Judgment Is Essential *Clinical Chemistry.* 2012; 58: 139–144.
20. Apple F.S. Standardization of Cardiac Troponin I Assays Will Not Occur in My Lifetime. *Clinical Chemistry.* 2012; 58: 1169–1177.
21. Christenson R.H., Bunk D.M., Schimmel H. et al. on behalf of the IFCC Point: Put Simply, Standardization of Cardiac Troponin I Is Complicated. Working Group on Standardization of Troponin I. *Clin. Chem.* 2012; 58 (1): 165–168.
22. Morrow D.A., Cannon C.P., Jesse R.L. et al. National Academy of Clinical Biochemistry practice guidelines: clinical characteristics and utilization of biomarkers in acute coronary syndromes. *Clin. Chem.* 2007; 53: 552–574.
23. Kelley W.E., Januzzi J.L., Christenson R.H. Increases of cardiac troponin in conditions other than acute coronary syndrome and heart failure. *Clin. Chem.* 2009; 55 (12): 2098–2112.
24. Venge P., Johnston N., Lindahl B. et al. Normal plasma levels of cardiac troponin I measured by the high-sensitivity cardiac troponin I Access prototype assay and the impact on the diagnosis of myocardial ischemia. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2009; 54: 1165–1172.
25. Sabatine M.S., Morrow D.A., de Lemos J.A. et al. Detection of acute changes in circulating troponin in the setting of transient stress test-induced myocardial ischemia using an ultrasensitive assay: results from TIMI 35. *Eur. Heart J.* 2009; 30: 162–169.
26. Mills N.L., Churchhouse A.M., Lee K.K. et al. Implementation of a sensitive troponin I assay and risk of recurrent myocardial infarction and death in patients with suspected acute coronary syndrome. *JAMA.* 2011; 305: 1210–1216.
27. Agewall S., Giannitsis E., Jernberg T. et al. Troponin elevation in coronary vs. non-coronary disease. *Eur. Heart J.* 2011; 32: 404–411.
28. McFalls E.O., Larsen G., Johnson G. et al. Long-term outcomes of hospitalized patients with a non-acute syndrome diagnosis and an elevated cardiac troponin level. *Am. J. Med.* 2011; 124: 630–635.

29. Twerenboldet R., Reichlin T., Reiter M. et al. High-sensitive cardiac troponin: friend or foe? Swiss. Med. Wkly. 2011; 141: E1–E5.

30. Apple F.S., Pearce L.A., Smith S.W. et al. Role of monitoring changes in sensitive cardiac troponin I assay results for early diagnosis of myocardial infarction and prediction of risk of adverse events. Clin. Chem. 2009; 55: 930–937.

31. Kavsak P.A., Ko D.T., Wang X. et al. Increasing cardiac troponin changes measured by a research high-sensitivity troponin I assay. Absolute vs percentages changes and long-term outcomes in a chest pain cohort. Clin. Chem. 2010; 56: 1902–1904.

32. Reichlin T., Irfan A., Twerenbold R. et al. Utility of absolute and relative changes in cardiac troponin concentrations in the early diagnosis of acute myocardial infarction. Circulation. 2011; 124: 136–145.

33. Mueller M., Biener M., Vafaie M. et al. Absolute and relative kinetic changes of high-sensitivity cardiac troponin T in acute coronary

syndrome and in patients with increased troponin in the absence of acute coronary syndrome. Clin. Chem. 2012; 58: 209–218.

34. Apple F.S., Morrow D.A. Delta Cardiac Troponin Values in Practice: Are We Ready to Move Absolutely Forward to Clinical Routine? Clinical Chemistry. 2012, 58 (1): 8–10.

35. Celik S., Giannitsis E., Wollert K.C. et al. Cardiac troponin T concentrations above the 99th percentile value as measured by a new high-sensitivity assay predict long-term prognosis in patients with acute coronary syndromes undergoing routine early invasive strategy. Clin. Res. Cardiol. 2011; 100 (12): 1077–1085.

36. Keller T., Zeller T., Peetz D. et al. Sensitive troponin I assay in early diagnosis of acute myocardial infarction. N. Engl. J. Med. 2009; 361: 868–877.

37. Reichlin T., Hochholzer W., Bassetti S. et al. Early diagnosis of myocardial infarction with sensitive cardiac troponin assays. N. Engl. J. Med. 2009; 361: 858–867.



ИЗДАТЕЛЬСКО-ПОЛИГРАФИЧЕСКАЯ КОМПАНИЯ **КОСТА**

Мы сделали Вашу рукопись Книгой

Издательско-полиграфический отдел фирмы «КОСТА» с 1993 года занимается подготовкой и изданием книг.

За эти годы мы приобрели большой опыт подготовки специальной, и в частности, медицинской литературы. Среди подготовленных нами книг — работы в области кардиологии, неврологии, хирургии, генетики и других областях медицины.

Мы будем рады помочь Вам подготовить к печати юбилейный сборник, монографию, брошюру, методические рекомендации, автореферат.

Собственная полиграфическая база позволяет оперативно отпечатать любую полиграфическую продукцию. Кроме того, наши дизайнеры разработают для Вас визитки, наклейки, рекламные листовки, обложки книг.

Не тратьте драгоценное время Ваших специалистов — приходите к нам.

Сделать Вашу рукопись книгой — наша специальность.

**Издательско-полиграфическая компания «КОСТА»
(812) 445-10-02 www.kostaprint.ru**

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ НЕКОТОРЫХ ОНКОГЕНОВ И ВОЗМОЖНОСТИ ЕЕ ПРАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Т.А. ШТАМ, Г.Р. ВИНОГРАДСКАЯ, А.В. ВОЛНИЦКИЙ, Р.А. КОВАЛЕВ,
Е.В. СЕМЕНОВА, М.В. ФИЛАТОВ

Федеральное государственное бюджетное учреждение

«Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова», г. Гатчина

Резюме. Одной из причин перерождения нормальных клеток в злокачественные является отклонение от нормы эпигенетического статуса клетки. В связи с этим для прогноза течения онкологических заболеваний и чувствительности их к тому или иному виду терапии существенно оценивать экспрессию ключевых онкогенов и антионкогенов. С другой стороны, активное воздействие на экспрессию генов, связанных с малигнизацией, может позволить находить новые потенциальные мишени для терапии злокачественных новообразований и совершенствовать возникшие в последнее время методы эпигенетической терапии. Здесь мы представляем несколько примеров, связанных с оценкой экспрессии некоторых ключевых онкогенов или онкосупрессорных генов (PTEN, Sox2 и p73) в глиомных опухолях человека. Кроме того, в данной работе продемонстрирована возможность эпигенетического «выключения» ключевого гена гомологической рекомбинации Rad51 с помощью системы коротких интерферирующих РНК. При этом показано, что такое временное снижение экспрессии гена Rad51 приводит к остановке клеточного цикла и гибели злокачественно трансформированных клеток. Также в представленной работе на нескольких клеточных моделях проведена оценка потенциальных противоопухолевых возможностей некоторых видов терапевтических препаратов эпигенетической направленности.

Ключевые слова: эпигенетика, экспрессия гена, гистоновый код, PTEN, Sox2, p53, p73, Rad51, ингибиторы гистоновых деацетилаз.

EPIGENETIC ABERRATIONS: DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC IMPLICATIONS IN HUMAN CANCER

T.A. SHTAM, G.R. VINOGRADSKAYA, A.V. VOLNICKIY, R.A. KOVALEV,
E.V. SEMENOVA, M.V. FILATOV

Federal State Budget Institution "Petersburg Nuclear Physics Institute", Gatchina

Summary. Almost all cancer cells have multiple epigenetic abnormalities. In this work we focus on the epigenetic mechanisms of several genes' expression regulation. Here, we describe how altered histone modifications and a repressive chromatin structure constitute an epigenetic process to down regulate PTEN in human cancer cell lines. Utilizing chromatin immunoprecipitation (ChIP) we observed decreased level of acetylated H3K4 and increased level of methyl H3K9 at key regulatory elements of the PTEN gene in the most part of investigated cell lines. Further, we examined the several glioma cell lines for expression of markers associated with neural stem cells. We compared the expression of Sox2 in several gliomas to that of their normal tissue counterparts using analysis of the gene transcripts by real-time reverse transcription PCR and Immunodetection of Sox2 protein level. We found significant overexpression of pluripotency factor Sox2 in the investigated glioma cells. Besides, we also examined the p73 expression status in several gliomas. Isoform-specific real-time reverse transcription-PCR was used for the analysis of Tp73 isoform transcript expression in some glial tumor cell lines. Our data demonstrate high level of TAp73 and DeltaEx2 transcripts at approximately 50% of tumors studied. Finally, in this work, we demonstrate that artificial short-term silencing of Rad51 gene by specific small interfering (si)RNA induce cell death of the most part of investigated cancer cell lines. These results suggest that Rad51 is a potential anticancer target for different cancers.

Key words: epigenetic, gene expression, histone code, PTEN, Sox2, p53, p73, Rad51, histone deacetylase inhibitors.

Данные для корреспонденции:

Филатов Михаил Валентинович, к.б.н., старший научный сотрудник,
заведующий лабораторией клеточной биологии. Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова»,
Отделение молекулярной и радиационной биофизики, лаборатория клеточной биологии,
188300, Ленинградская область, г. Гатчина, Орлова роща, тел.: (81371) 466-26,
e-mail: fil_53@mail.ru, filatov@omrb.pnpi.spb.ru

Представление о необратимых мутационных повреждениях генетического материала как единственной причине злокачественной трансформации постепенно уступает место пониманию того, что эпигенетические модификации, связанные с потенциально обратимыми изменениями экспрессии генов, как минимум, не менее значимы. Эпигенетическая регуляция активности генов связана с рядом взаимоусиливающих механизмов, включающих изменения в метилировании ДНК; посттрансляционных модификациях гистонов и регулирующих роли микроРНК (miРНК) и коротких интерферирующих РНК (siРНК). В связи с этим для прогноза течения онкологических заболеваний и чувствительности их к тому или иному виду терапии существенно оценивать экспрессию ключевых онкогенов и антионкогенов. С другой стороны, активное воздействие на экспрессию генов, связанных с малигнизацией, может позволить находить новые потенциальные мишени для терапии злокачественных новообразований и совершенствовать возникшие в последнее время методы эпигенетической терапии. Здесь мы представляем несколько примеров, связанных с оценкой экспрессии некоторых ключевых онкогенов или онкосупрессорных генов (*PTEN*, *Sox2* и *p73*) в глиомных опухолях человека. Кроме того, в данной работе продемонстрирована возможность эпигенетического «выключения» ключевого гена гомологической рекомбинации *Rad51* с помощью системы коротких интерферирующих РНК. При этом показано, что такое временное снижение экспрессии гена *Rad51* приводит к остановке клеточного цикла и гибели злокачественно трансформированных клеток. Также в представленной работе на нескольких клеточных моделях проведена оценка потенциальных противоопухолевых возможностей некоторых видов терапевтических препаратов эпигенетической направленности.

Материалы и методы

Перевиваемые культуры клеток человека Hela (аденокарцинома шейки матки), MCF-7 (аденокарцинома молочной железы), HT1080 (фибросаркома), ECV (трансформированные клетки эндотелия), GM08632 (кожные фибробласты, трансформированные вирусом SV40), Mg63 (остеосаркома), глиомные клеточные линии A-172 и T98G, первичные культуры глиального происхождения, полученные в нашей лаборатории, а также эмбриональные фибробласты легкого (ФЛЭЧ) и фибробласты кожи человека (ФКЧ) культивировались при стандартных условиях в среде DMEM/F12, с добавлением 5–10% эмбриональной сыворотки, в 5% CO₂ атмосфере, при 37° С.

Транфекцию анти*RAD51*-siРНК, или добавление к культуральной среде бутирата натрия (NaBu) или его модификаций в концентрации 5mM осуществляли через 24 часа после посева. По истечении 24–96 часов инкубации клеток с указанными добавками клетки либо рассеивались во флаконы Карреля для определения спо-

собности давать колонии, либо анализировались с помощью проточного цитометра по стандартному протоколу для выявления возможных нарушений в прохождении клеточного цикла. Транфекцию анти*RAD51*-siРНК (Dharmacon) в концентрации 100 нМ/мл в 1х трансфекционном буфере проводили с использованием липофектамина (Dharmacon-FECT). В качестве контроля аналогичные измерения проводились на клетках трансфицированных siРНК другой специфичности (антиТК-siРНК).

Для реализации процедуры иммунопреципитации хроматина (chromatin immunoprecipitation ChiP) клетки первичных культур глиального происхождения (3×10⁶ клеток) в течение 10 мин. инкубировали в присутствии 1% формальдегида для образования сшивок между ДНК и гистонами. Затем в течение 20 минут на льду лизировали в 600μl буфера, содержащего 150 mM NaCl; 25 mM Tris-HCl, pH 7,5; 5mM EDTA; 1% Triton X-100; 0,1% SDS; 0,5% sodium deoxycholate и ингибиторы протеаз. Лизат «озвучивали» на дезинтеграторе 10×10 секунд, после чего центрифугировали при 13 000 оборотах/мин. в течение 15 минут при 4° С. Супернатант разводили 1:5 буфером, содержащим 25 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA; 1% Triton X-100 и ингибиторы протеаз, и делили на 3 равные части. Первая часть использовалась в качестве контроля, ко второй части добавляли anti-trimethyl-Histon H3 (Lys9) антитела, к третьей — anti-acetyl-Histon H3 (Lys4) антитела и при постоянном вращении инкубировали ночь при 4° С. Затем иммунокомплексы адсорбировали на протеин-А-агарозу, и после нескольких промывок агарозы элюировали буфером, содержащим 1% SDS и 0,1M NaHCO₃. Сшивки между ДНК и гистонами разрушали, инкубируя элюаты в течение 6 часов при 65° С в присутствии 200 mM NaCl. После обработки элюатов в течение 1 часа при 45° С протеиназой K (100 μg/ml) осуществляли экстракцию ДНК смесью фенол-хлороформ по стандартной методике. ДНК ресуспендировали в H₂O и использовали при ПЦР-анализе.

Общую РНК выделяли с помощью набора The Aurum total RNA minikit (BioRad) с добавлением ДНКазы I, а обратную транскрипцию (ОТ) осуществляли с помощью набора iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad) в соответствии с протоколом производителя. Реакцию проводили на детектирующем амплификаторе ДТ-322. Определение пороговых циклов и расчет относительных уровней производили с помощью программы RealTime_PCR v7.3 (НПО ДНК-Технология). Результаты представлены в виде отношения уровней исследуемых генов и нормировочного гена *GAPDH*.

Экспрессию генов *Sox2*, *p21/Waf*, а также эффективность подавления экспрессии гена *Rad51* оценивали по уровню содержания белков *SOX2*, *p21/Waf* и *RAD51*, выявляемого с помощью иммуноблоттинга на PVDF мембраны белков исследуемых клеток. Визуализацию белков *SOX2*, *RAD51* и *p21/WAF* на мембране осущест-

вляли с помощью моноклональных антител в разведении 1 : 1000 (mouse antiSOX2, Upstate; mouse antiRAD51 clone 3C10, Invitrogen и mouse antiP21, Upstate) и последующей инкубацией с антителами против иммуноглобулинов (IgG) мыши, конъюгированных с ферментативной активностью пероксидазы хрена (Sigma), которые выявляли методом усиленной хемилюминесценции (Pierce).

Полученные результаты

Эпигенетические изменения экспрессии гена *PTEN* в глиомах человека

PTEN относится к опухолевым супрессорам, часто поражаемым в различных новообразованиях человека. Инактивация *PTEN* характеризует значительную часть различных ненаследственных опухолей: глиомы, менингиомы, меланомы, рака почки, матки, молочной и предстательной желез [1]. При этом на начальных стадиях заболевания выявляется, как правило, делеция только одного из аллелей гена *PTEN*, тогда как в опухолях, находящихся на поздних стадиях развития, чаще инактивированы оба аллеля [1, 5]. Белковый продукт гена *PTEN* имеет высокую степень гомологии с фосфатазами двойной специфичности. Именно эта активность белка *PTEN* ответственна, по-видимому, за его супрессорную функцию. Потеря функции *PTEN* делает клетки менее чувствительными ко многим апоптогенным стимулам. В клетках с инактивированным *PTEN* наблюдается также и стимуляция клеточной пролиферации [4]. Есть основания полагать, что наряду с мутационными нарушениями гена *PTEN*, в злокачественных опухолях часто имеет место подавление его экспрессии, сопряженное с изменением профиля модификаций белков хроматина — гистонового кода.

В этой работе мы проанализировали т. н. «маркеры активности хроматина» в области гена *PTEN* в ряде первичных культур глиом. Комбинация посттрансляционных модификаций гистонов составляет «гистоновый код» клетки. Используя метод иммунопреципитации хроматина с дальнейшим ПЦР анализом, мы продемонстрировали приобретение триметилирования 9-го лизина гистона H3 и потерю ацетилирования 4-го лизина гистона H3 (что является указанием на подавление транскрипционной активности гена) в областях 1-го и 5-го экзонов гена *PTEN* в подавляющем большинстве исследованных клеток первичных глиом (рис. 1). Таким образом, анализ гистонового кода антионкогена *PTEN* продемонстрировал, что этот ген не активен в большинстве исследованных глиальных опухолей. Учитывая тот факт, что эпигенетические нарушения в принципе обратимы, представленные результаты позволяют рассматривать онкосупрессор *PTEN* как потенциальную мишень для противоопухолевой терапии эпигенетической направленности.

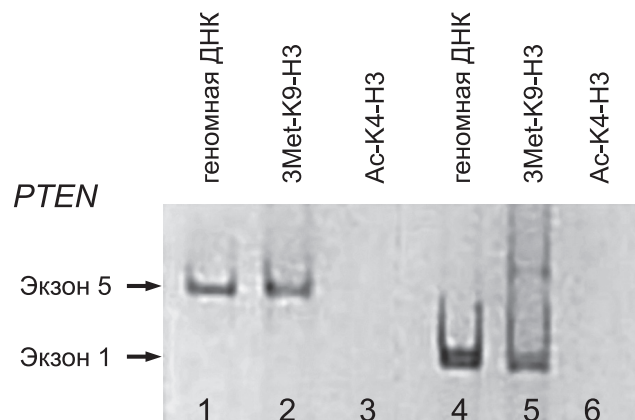


Рис. 1. Пример исследования посттрансляционных модификаций гистона H3 локуса *PTEN* (1-й и 5-й экзоны) методом иммунопреципитации хроматина с последующим ПЦР-анализом.

Дорожки 1, 4 — результат амплификации экзонов 5 и 1 с totalной ДНК; 2, 5 — результат амплификации экзонов 5 и 1 с ДНК, полученной при иммунопреципитации хроматина с антителами против 3-метилированного лизина-9 гистона H3; 3, 6 — результат амплификации экзонов 5 и 1 с ДНК, полученной при иммунопреципитации хроматина с антителами против ацетилированного лизина-4 гистона H3. Очевидно, что ген *PTEN* ассоциирован с фракцией хроматина, содержащей гистон H3, триметилированный по 9-му лизину, и отсутствует во фракции с гистон H3, ацетилированным по 4-му лизину

Активация гена *Sox2* в глиомах человека

В настоящее время популярна гипотеза, связывающая онкогенез глиом со свойствами стволоподобных опухолевых клеток. Недавно стало известно, что репрограммирование соматических клеток человека в плюрипотентные стволовые клетки может происходить при внедрении в клетки исходной культуры так называемых генов плюрипотентности, способных вернуть взрослые клетки в эмбриональное состояние. Схема репрограммирования основана на трансфекции соматических клеток набором генов *Oct4*, *Sox2*, *c-myc* и *Klf4* или *Oct4*, *Sox2*, *Nanog* и *Lin28*. Гены *Oct4* и *Sox2* кодируют ключевые транскрипционные факторы, необходимые для пролиферации и поддержания плюрипотентности стволовых клеток [7]. Появление экспрессии этих генов в опухолях тканей, которые в норме их не экспрессируют, может указывать на вероятную роль этих генов в канцерогенезе и определять новые возможности для диагностики и терапии онкологических заболеваний [8].

В этой работе мы исследовали экспрессию *Sox2* в первичных культурах клеток, полученных из послеоперационного материала пациентов со злокачественными глиомами. Полученные данные демонстрируют, что *Sox2* ген активируется в глиомных опухолях. Методами ПЦР в реальном времени, иммуноблоттинга и через гистоновый код (потеря триметилирования 9-го лизина гистона H3 и приобретение ацетилирования 4-го лизина гистона H3) нами показана активация в глиомах гена *Sox2* (рис. 2), который обычно не экспрессируется

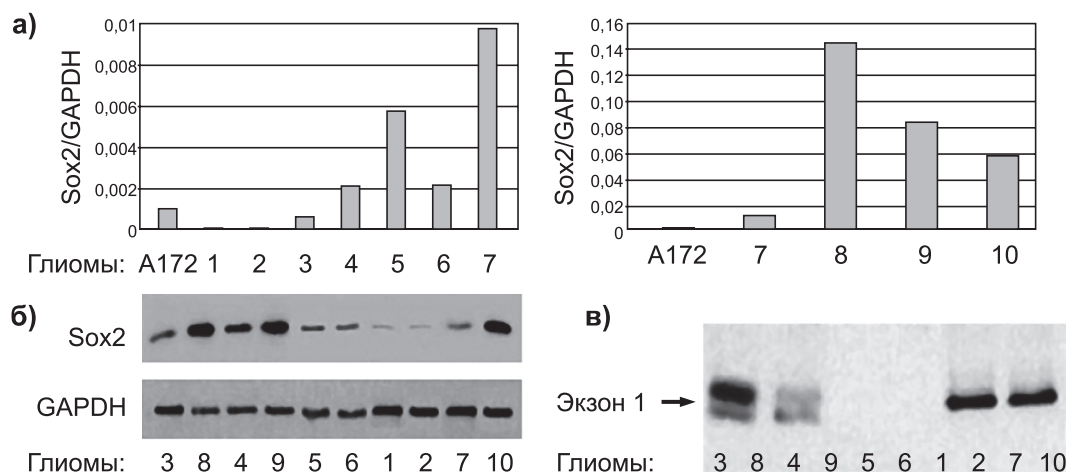


Рис. 2. Экспрессия гена *Sox2* в глиомах.

Активность гена *Sox2* анализировалась а) на уровне мРНК; б) по количеству белкового продукта; в) посредством исследования организации хроматина (посттрансляционных модификаций гистона H3) в промоторной области, т. е. с помощью гистонового кода

в клетках центральной нервной системы [8]. Кроме того, в этой работе обнаружена корреляция активности гена *Sox2* и скорости роста *in vitro* культур клеток, полученных из глиом. Этот факт позволяет высказать гипотезу, что уровень экспрессии *Sox2* отражает содержание в опухоли стволоподобных клеток, чем их больше, тем быстрее растет опухоль *in vitro*. Таким образом, уже на данном этапе наши результаты указывают на возможность использования *Sox2* в качестве мишени для диагностики и терапии глиом.

Экспрессия гена *p73* в глиомах

Белок *p73* является активатором транскрипции генов, контролирующих задержку клеточного цикла (*p21*) и апоптоз (*PUMA*, *Noxa*, *Bax* и др.) [6]. В отличие от гомологичного ему *p53* ген *p73* редко повреждается в злокачественных новообразованиях [6, 10]. Однако в различных типах опухолей было обнаружено, что *p73* представлен сразу несколькими изоформами. С первого промотора считываются изоформа с полным транскрипционным доменом (ТА) и две изоформы, у которых в транскрипционном домене отсутствуют 2-й или 2-й и 3-й экзоны (*ex2* и *ex2/3*). Показано, что изоформы с измененным транскрипционным доменом блокируют действие полноразмерного *p73*, способствуя канцерогенезу [10]. Таким образом, изоформы *p73* с измененным транскрипционным доменом являются маркерами канцерогенеза и потенциальными мишенями для противоопухолевой терапии.

В этой работе мы представляем исследование экспрессии различных изоформ *p73* на транскрипционном уровне в глиомах. Нами подобрана оптимальная система праймеров и флуоресцентно меченых зондов для ОТ-ПЦР в реальном времени, позволяющая однозначно определять ассортимент изоформ мРНК гена *p73* и из-

мерять их относительные уровни. Экспрессия *p73* исследована в девяти глиомах (клеточные линии A172, T98G и 7 первичных культур). В пяти из них экспрессия этого гена не была обнаружена, тогда как в других четырех глиомах экспрессия *p73* представлена в основном полноразмерной изоформой ТА и укороченной онкогенной изоформой *ex2* (рис. 3). Так как различный статус *p73* в злокачественных глиомах потенциально может по-разному влиять на чувствительность опухоли к терапевтическому воздействию, вопрос о роли укороченных изоформ белка *p73* в развитии глиом требует дальнейшего изучения.

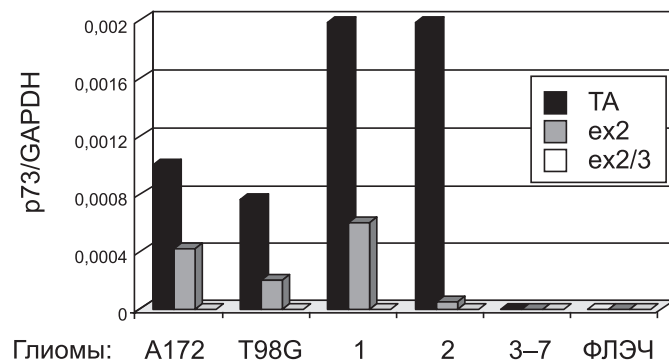


Рис. 3. Экспрессия гена *p73* и его изоформ на транскрипционном уровне в глиомах

Влияние временного выключения экспрессии гена *Rad51* за счет интерференции с короткой интерференционной РНК на жизнеспособность ряда клеточных линий

Эукариотический белок *RAD51*, структурный и функциональный гомолог бактериального белка *RecA*, играет основную роль в митотической и мейотической

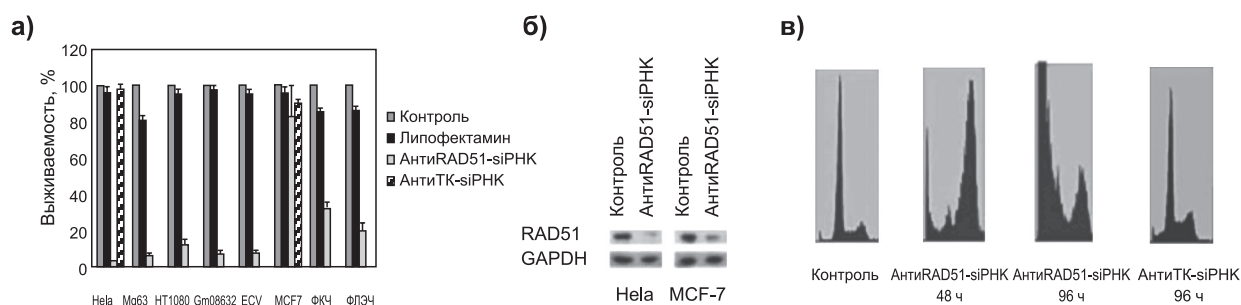


Рис. 4. Временное выключение гена *Rad51* в клетках различных линий с использованием системы интерференции РНК.

а) Выживаемость злокачественно трансформированных клеток линий HeLa, Mg63, HT1080, gM08632, ECV и MCF-7, а также фибробластов кожи человека (ФКЧ) и эмбриональных фибробластов легкого (ФЛЭЧ) при подавлении экспрессии гена *Rad51*; б) Иммуноблоттинг клеточных лизатов линий HeLa и MCF-7: клетки, трансфицированные анти*RAD51*-siРНК в течение 48 часов, и контрольные, культивируемые при стандартных условиях; в) Анализ изменений, происходящих в клеточном цикле в клетках HeLa через 48 и 96 часов после трансфекции анти*RAD51*-siРНК

гомологичной рекомбинации. Система гомологичной рекомбинации — одна из многочисленных систем поддержания стабильности генетического материала клеток млекопитающих. Очевидно, что значение этой системы должно быть особо существенно в ситуациях, когда клетки подвергаются неблагоприятным воздействиям, затрагивающим стабильность генетического материала и нормальное течение процесса репликации [2]. Однако при отсутствии внешних повреждающих воздействий необходимость эффективной работы системы гомологичной репарации для жизнеспособности клеток не кажется очевидной.

В этой работе мы показали, что подавление функции гена *Rad51* может приводить к массовой репродуктивной гибели клеток человека в отсутствие внешних повреждающих воздействий (рис. 4а) [11]. Так, в большинстве исследованных клеток человека подавление экспрессии гена *Rad51* за счет нокдауна с помощью siРНК (рис. 4б) приводит к невозможности полноценно завершить текущий период репликации ДНК, что выражается в виде блока клеточного цикла в S и/или G2 фазе (рис. 4в). Такого рода блоки приводят к драматическому снижению жизнеспособности этих клеток, сопровождающемуся апоптозом или необратимой потерей способности к пролиферации.

В то же время обнаруженное явление не является универсальным, и некоторые клеточные линии, в частности MCF-7 в данном исследовании, оказываются устойчивыми к подавлению экспрессии гена *Rad51* (рис. 4а). Представленные результаты позволяют рассматривать *RAD51*-рекомбиназу как потенциальную мишень для противораковой терапии.

Клеточный ответ злокачественно трансформированных клеток человека различного тканевого происхождения на эпигенетическую терапию бутиратом натрия и его модификаций

Часто причиной перерождения нормальных клеток в злокачественные является отклонение от нормы эпи-

генетического статуса клетки. Способ, базирующийся на подавлении деацетилаз — ферментов, удаляющих ацетильные группы с гистонов, — является наиболее простым и доступным из эпигенетических терапевтических подходов лечения злокачественных опухолей. Таким образом, деацетилазы гистонов (ГДАЦ) становятся одними из наиболее перспективных мишеней при разработке новых типов противоопухолевых лекарств [3]. В этой работе мы изучили влияние ингибитора ГДАЦ естественного происхождения, бутирата натрия (BuNa), на пролиферацию и жизнеспособность различных злокачественно трансформированных клеток человека. На примере нескольких клеточных линий, включающих как перевиваемые, так и первичные клеточные опухолевые культуры, мы продемонстрировали антипролиферативный эффект BuNa (рис. 5а). При воздействии этого вида ингибиторов ГДАЦ происходит остановка клеточного цикла, сопровождающаяся индукцией белка *p21/waf* — одного из негативных регуляторов клеточного цикла во всех исследованных клеточных линиях (рис. 5в). Однако необходимый для максимально успешной терапии апоптотический ответ клетки на воздействие препаратами рассматриваемого класса наблюдался лишь в клетках некоторых перевиваемых линий. Так, например, инкубация с BuNa в концентрации 5mM в течение 72 часов клеток линий HT1080 и MCF-7 приводила к более чем стократному уменьшению числа злокачественных клеток и необратимому подавлению способности к пролиферации (рис. 5а). При этом клетки других линий, в том числе первичных культур глиального происхождения, демонстрировали относительную устойчивость к воздействию BuNa. Для преодоления этой проблемы и, соответственно, смещения клеточного ответа с блока клеточного цикла в сторону апоптоза при воздействии препаратами класса ингибиторов ГДАЦ мы проанализировали серию различных химических модификаций BuNa (M-BuNa). Полученные результаты, представленные на рисунке 5б, демонстрируют большую эффективность некоторых модифицированных соединений класса ингибиторов ГДАЦ по сравнению с BuNa.

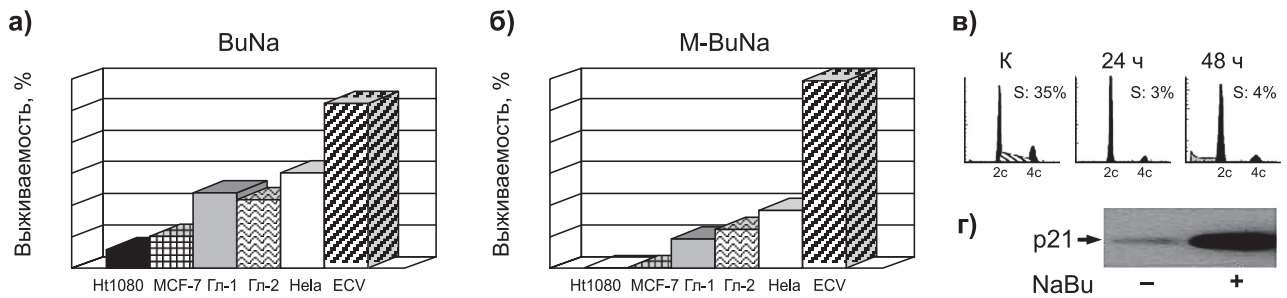


Рис. 5. Влияние ингибитора деацетилаз бутирата натрия и его модификаций на различные злокачественно трансформированные клетки человека.

а) Выживаемость клеток линий HT1080, MCF-7, 2- первичных глиом, HeLa и ECV при обработке BuNa в концентрации 5mM в течение 72 часов; б) Выживаемость клеток этих же линий при обработке одной из модификаций BuNa в концентрации 5mM в течение 72 часов; в) Параметры клеточного цикла при обработке клеток BuNa в концентрации 5mM в течение 24 и 48 часов; г) Индукция белка *p21* при обработке клеток BuNa в концентрации 5mM в течение 48 часов

В целом представленные здесь данные полностью соответствуют результатам исследований ведущих лабораторий мира об эпигенетических подходах к диагностике, прогнозированию и методам лечения опухолевых заболеваний различной локализации [9]. Однако понимание роли эпигенетических нарушений при развитии онкологического заболевания все еще не полно; это увлекательный новый фронт работы, обещающий дать ответы на многие вопросы о механизмах канцерогенеза.

Работа выполнена при поддержке Фонда РФФИ (грант 05-04-48902-а), а также персонального гранта правительства Санкт-Петербурга Ковалеву Р.А. и гранта ООО «ТВН» (проект «У.М.Н.И.К.» № 14023, тема № 3) Волницкому А.В.

Литература

- Jiang B.H., Liu L.Z. PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. *Adv. Cancer Res.* 2009; 102: 19–65.
- Li X., Heyer W.D. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res.* 2008, Jan; 18 (1): 99–113.
- Minucci S., Pelicci P.G. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nature rev. cancer.* 2006; 6: 38–51.

- Navis A.C., van den Eijnden M., Schepens J.T. et al. Protein tyrosine phosphatases in glioma biology. *Acta Neuropathol.* 2010, Feb; 119 (2): 157–175.
- Network Cancer Genome Atlas Research. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature.* 2008; 455: 1061–1068.
- Pietsch E.C., Sykes S.M., McMahon S.B., Murphy M.E. The p53 family and programmed cell death. *Oncogene.* 2008; 27 (50): 6507–6521.
- Rizzino A. Sox2 and Oct-3/4: a versatile pair of master regulators that orchestrate the self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 2009, Sep-Oct; 1 (2): 228–236.
- Schmitz M., Temme A., Senner V. et al. Identification of SOX2 as a novel glioma-associated antigen and potential target for T cell-based immunotherapy. *British Journal of Cancer.* 2007; 96: 1293–1301.
- Sharma S., Kelly T.K., Jones P.A. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis.* 2010, Jan; 31 (1): 27–36.
- Zawacka-Pankau J., Kostecka A., Sznarkowska A. et al. p73 tumor suppressor protein: a close relative of p53 not only in structure but also in anti-cancer approach? *Cell Cycle.* 2010, Feb 15; 9 (4): 720–728.
- Штам Т.А., Варфоломеева Е.Ю., Семенова Е.В., Филатов М.В. Влияние уровня экспрессии RAD51-рекомбиназы на выживаемость и прохождение фаз цикла клетками человека. *Цитология.* 2008; 50 (11): 958–963.

**НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ
«ОПТИМИЗАЦИЯ ДИАЛОГА ЛАБОРАТОРИИ И КЛИНИЦИСТА»**

Сопредседатели:

Дубина М.В. — проректор по научной работе Санкт-Петербургского академического университета РАН, член-корр. РАН, д. м. н., профессор

Шляхто Е.В. — академик РАМН, директор ФГУ «ФЦ сердца, крови и эндокринологии имени В.А. Алмазова», зав. кафедрой факультетской терапии им. Г.Ф. Ланга СПбГМУ им. И.П. Павлова, д. м. н., профессор

Планируемые темы выступлений:

1. **Титов В.Н.** (Москва): «Диабет — проблема века: пути решения».
2. **Смирнов А.В.** (СПб): «Кардиоренальный континуум — лабораторные признаки».
3. **Дубина М.В.** (СПб): «Молекулярно-биологический уровень клинической медицины».
4. **Мазуров В.И.** (СПб): «Лабораторные технологии в аутоиммунной патологии».
5. **Эмануэль В.Л.** (СПб): «Проблемы образования в области лабораторной медицины».
6. **Долгих Т.И.** (Омск): «Метрологические аспекты лабораторных технологий».

Для участия в конференции необходима предварительная регистрация (приложение). По итогам конференции планируется издание сборника материалов. Заявку, тезисы/статью необходимо прислать на электронный адрес 2339726@gmail.com с пометкой «Конференция».

Требования к тезисам

Тезисы (в текстовом редакторе Word) отправляются отдельным вложенным файлом, который должен быть назван по фамилии первого автора (латинскими буквами).

Объем тезисов не должен превышать 1800 знаков (таблицы, формулы и графические рисунки к публикации не принимаются), кегль — 14, шрифт — Times New Roman, интервал — 1,0; ссылки на литературу оформляются в квадратных скобках с указанием номера и страницы источника в списке литературы, приводимом в конце тезисов и расставленном по порядку цитирования.

Информация о тезисах должна включать: название (заглавными буквами), ФИО, место работы (организация) автора(ов), а также контактный телефон, e-mail (для обратной связи).

Требования к статьям

Статья (в текстовом редакторе Word), рисунки и таблицы отправляются отдельными вложенными файлами, которые должны быть названы по фамилии первого автора (файлы с таблицами и рисунками должны быть названы по фамилии первого автора латинскими буквами с указанием нумерации рисунка или таблицы в статье, например, «*Ivanov, рис. 1*», «*Ivanov, табл. 3*»).

Объем оригинальной статьи не должен превышать 15 страниц, кегль — 14, шрифт — Times New Roman, интервал — 1,0; ссылки на литературу оформляются в квадратных скобках с указанием номера и страницы источника в списке литературы, приводимом в конце статьи и расставленном по порядку цитирования.

Информация о статье должна включать: название (заглавными буквами), ФИО, место работы (организация) автора(ов), ключевые слова, краткую аннотацию на русском и английском языках, а также контактный телефон, e-mail (для обратной связи).

Стоимость публикаций тезисов — 200 руб., статей — 500 руб. (для студентов и аспирантов — бесплатно). Решение о публикации материалов принимает Научный совет конференции. Счет на оплату высылается по факту предоставления материалов.

Оргкомитет принимает заявки на участие представителей компаний по производству и распространению материалов для лабораторной диагностики.

Приложение

ЗАЯВКА

участника конференции с международным участием
«Оптимизация диалога лаборатории и клинициста»
(Санкт-Петербург, СПбГМУ им. И.П. Павлова, 4–5 июня 2012 г.)

| | | |
|---|------------------------------------|--|
| 1 | Фамилия, Имя, Отчество (полностью) | |
| 2 | Место работы | |
| 3 | Должность | |
| 4 | Город | |
| 5 | Почтовый адрес с указанием индекса | |
| 6 | Контактный телефон | |
| 7 | E-mail | |

Заявку необходимо оформить и отправить отдельным файлом, например, **Petrova L.N._заявка.doc**

По вопросам участия в конференции обращаться по телефону: (812) 233-97-26.