

**МЕТОД ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ АЛЛЕРГИИ ПУТЕМ АНАЛИЗА
ПАРАМЕТРОВ СТИМУЛИРОВАННОГО СВЕЧЕНИЯ КРОВИ**

Степанов А.В.¹, Свиридов Л.П.¹, Ахметели Г.Г.¹, Коротков К.Г.², Юсубов Р.Р.¹

¹ООО «Биотехпрогресс», Санкт-Петербург, ²Федеральное государственное учреждение «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт физической культуры»

АННОТАЦИЯ

Представлен оригинальный метод этиологической диагностики аллергии путем анализа параметров стимулированного свечения образцов крови с внесенными потенциальными аллергенами в сравнении с контрольными образцами. В итоге сравнительного анализа результатов исследования 53 проб крови больных аллергией, полученных с помощью развитого метода и общепризнанных иммунологических методов выявлена достаточно высокая частота их совпадения – в 81 % случаев. Представленные материалы демонстрируют перспективность развитого метода для определения этиологии аллергии.

ВВЕДЕНИЕ

В связи с высокой распространенностью аллергий проблема этих заболеваний в последние годы приобрела особую актуальность. Уже в течение нескольких десятилетий отмечается неуклонный рост их числа. Как свидетельствуют многие публикации, в настоящее время этим недугом страдает, по меньшей мере, каждый третий-четвертый житель планеты [1,2]. Не случайно в аллергологию введено такое понятие, как «эпидемиология аллергий», что подразумевает скорость и широту

охвата новых контингентов сопоставимо с эпидемиями инфекций [3]. Сложившаяся ситуация вполне обоснованно вызывает тревогу и диктует необходимость разработки действенных мер профилактики и изыскания более совершенных средств и методов диагностики и лечения аллергий. Несмотря на многочисленные исследования, связанные с усовершенствованием методов определения природы причинно значимого фактора, лабораторная диагностика пока не в полной мере отвечает предъявляемым к ней требованиям.

В настоящей работе был использован метод газоразрядной визуализации (ГРВ). Его принцип состоит в компьютерной регистрации и анализе свечения жидкостей, в том числе и биологических, при эмиссии их молекул в электромагнитном поле высокого напряжения [4]. Причем, как убедительно подтверждено экспериментально, характер этого свечения зависит от физико-химических свойств исследуемых растворов: изменение показателей их физико-химического состояния сказывается на эмиссионных свойствах объекта и, как следствие, картине ГРВ-грамм [4-7].

Методика

На рис. 1 изображена экспериментальная установка для исследования газоразрядного свечения капли жидкости.

Специализированный генератор формирует серии униполярных импульсов напряжения с частотой 50 кГц при частоте повторения серий 1 кГц. Амплитуду импульсов напряжения можно изменять в диапазоне от 10,5 кВ до 17 кВ. Импульсы подаются на токопроводящее прозрачное покрытие, нанесенное на обратной стороне кварцевой пластины. Импульсное электрическое поле стимулирует электронную и фотонную эмиссию с поверхности объекта, находящегося вблизи поверхности кварцевой пластины, что приводит к развитию скользящего по поверхности диэлектрика газового разряда.

Для реализации поставленной цели использована технология оценки характеристик газового разряда вокруг капли, находящейся на окончании капилляра одноразового инсулинового шприца (дозатора) и получаемой путем выдавливания из него исследуемого материала. Между штоком дозатора и диэлектрической

пластиной прикладывалась разность потенциалов, приводящая к возникновению разряда в стримерной стадии. Разряд развивался в зазоре между поверхностью капли и пластиной. Величина зазора составляла 3 мм.

Использовался серийно выпускаемый прибор «ГРВ Камера» (производитель ООО «Биотехпрогресс» www.ktispb.ru). Из каждой пробы записывали ГРВ-граммы для 10 капель с частотой 30 кадров в секунду и продолжительностью воздействия электромагнитного поля 10 сек. ГРВ-грамма представляет собой сложную двумерную фигуру (рис.2), которая характеризуется яркостью, кодируемой целым числом в диапазоне от 0 до 255, площадью (количеством пикселей изображения выше определенной яркости) и другими параметрами [4]. Вид изображения определяется характером протекающих физических процессов. Стример с поверхности капли начинает развиваться из той точки поверхности, где напряженность электрического поля в данный момент времени максимальна и превышает пробойное значение. Следующая лавина будет развиваться только через время, когда плазма проводящего канала полностью или частично рекомбинирует. За время развития лавины в точке на поверхности капли, где она начала образовываться, возникает поверхностный заряд. После окончания протекания тока он начинает рассасываться. При концентрации солей $N < 5$ г/л, удельное сопротивление $\rho > 100$ Ом·м, характерное время рекомбинации заряда меньше, чем время рассасывания заряда на поверхности плазмы, $\tau_{\text{рас.}} > \tau_{\text{рек.}}$. Каждый последующий стример развивается из другой точки поверхности капли, чем предыдущий. Лавины образуются практически со всей поверхности капли. Картина свечения характеризуется достаточно густым распределением стримеров.

Вычисление основных параметров производится следующим образом.

Общая площадь изображения (в пикселях): $S = \sum_x \sum_y p_{ij}$, где $p_{ij} = 1$, если $b(i,j) \geq t$ и $p_{ij} = 0$, если $b(i,j) < t$; $b(i,j)$ – значение яркости элемента изображения (пикселя), t – пороговое значение яркости, определяемое экспертным путем в зависимости от решаемой задачи.

Интегральная яркость изображения (в относительных единицах от 0 – абсолютно черное, до 250 – абсолютно белое):

$$PJ = \sum_{i=0}^n d[i]i / \sum_{i=0}^n d[i];$$

где $d[i]$ - количество пикселей изображения, для которых $b(x,y)=i$, $i \in (0, 250)$;

Коэффициент формы (безразмерная величина, равная 4π для окружности и растущая при усложнении формы фигуры): $q = aL^2/S$, где L – длина периметра изображения свечения, S – общая площадь изображения свечения, a – калибровочный коэффициент.

Следующий комплекс расчетов основан на преобразовании исходного изображения из сферической системы координат в декартову систему одномерных кривых-векторов, что производится на основании уравнений Эйлера по яркостным и векторным эквиденситам. Изображение может быть представлено как безразмерная функция $F(x)$ некоторого аргумента x от угла в пределах $[0-2\pi]$. В качестве функции $F(x)$ может выступать максимальная длина радиуса изображения, длина медианы, яркость или средние величины по радиусу. Как правило, функция $F(x)$ неоднородна и меняется достаточно хаотически. Без больших погрешностей можно рассматривать ее как часть неограниченной переменной и применить аппарат описания статистических зависимостей, что позволяет вычислить ряд параметров. Наиболее важным из этих параметров является **информационная энтропия ГРВ-грамм**, алгоритм вычисления которой представлен в [5].

Методика подготовка проб. Гепаринизированную кровь пациента разливали в 4 стерильные пробирки по 0,25 мл. В две из них (контрольные) вносили по 0,05 мл разводящей жидкости, изготавливаемой производителями стандартных диагностических аллергенов (применялись препараты производства ОАО «Биомед» им. И.И.Мечникова); в две другие (опытные) – вносился в том же объеме потенциальный аллерген. Количество опытных проб крови определяется количеством подозреваемых (по данным анамнеза) аллергенов (1 аллерген – 2 опытных пробы, 2 аллергена – 4 опытных пробы и т.д.). Затем пробы инкубировались: половину в течение 1,5 ч при 37°C в термостате, половину – 24 ч, 1,5 ч в термостате, а затем при комнатной температуре. При этом, в соответствии с гипотезой исследования, в результате взаимодействия причинно значимого аллергена с присутствующими в крови больного специфическими антителами и sensibilizированными к нему клетками происходит образование иммунных

комплексов, повреждение мембран и распад форменных элементов, выход из них биологически активных веществ и др. процессы, что влечет изменение физико-химических характеристик и, следовательно, эмиссионных свойств исследуемого образца крови в течение его экспозиции. На разводящую (контрольную) жидкость и на аллерген, не имеющий этиологического значения для данного больного, реакция крови будет менее выраженной. Эти различия в реагировании выявляются с помощью ГРВ-графии.

Техника ГРВ-графии. После экспозиции кровь (15 мкл) наносилась дозатором на датчик прибора и производилась запись показаний в течение 10 сек при стандартном режиме экспозиции. В каждой пробе исследовалось 10-12 капель и результаты усреднялись. Информация обрабатывалась в программном ГРВ комплексе. Для каждой ГРВ-граммы вычислялись параметры: площадь свечения, коэффициент формы, энтропия по изолинии, средняя интенсивность. По результатам, полученным с образцами, выдержанными 1,5 ч и 24 ч, делалось заключение.

Критерием оценки служило статистически достоверное отличие параметров крови с аллергеном от крови с разводящей жидкостью хотя бы по одному из перечисленных параметров (рис.3). При отсутствии достоверных различий в реагировании крови на разводящую жидкость и аллерген результат следует считать отрицательным, то есть данный аллерген не имеет этиологического значения.

Для обоснования достоверности лабораторного установления этиологии аллергии с применением ГРВ были исследованы 53 пробы крови больных, страдающих данным заболеванием различного происхождения. При этом определяли этиологическую роль аллергенов из пера подушки (14 проб), домашней пыли (19 проб), клеща *Dermatophagoides pteronyssinus* (14 проб), белка куриного яйца (5 проб) и мяса утки (1 проба), которые, по данным аллергологического анамнеза, могли служить причиной болезни. Одновременно осуществляли тестирование тех же проб при помощи таких общепринятых методов, как реакция торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ) и иммуноферментный анализ (ИФА). О достоверности информации ГРВ-графии судили по частоте совпадения ее

результатов с данными общепринятых иммунологических исследований. Общий итог анализа представлен в таблице 1.

Таблица 1. Результаты выявления этиологически значимых аллергенов с помощью газоразрядной визуализации и общепринятых иммунологических тестов.

Аллерген	Количество проб в группах	% совпадений
Перо подушки	14	78
Домашняя пыль	19	79
Клещ <i>D.pteronissynus</i>	14	78
Белок куриных яиц	5	100
Мясо утки	1	100
Всего исследовано проб	53	
% совпадений	81	

Как видно, из общего числа исследований (53 пробы) совпадение результатов, полученных с применением метода ГРВ и общепризнанных иммунологических методов наблюдалось в 43 случаях, что составляло 81 %. Если такое сравнение проводить по каждому аллергену в отдельности, то корреляция ответов также достаточно высока: от 78 % до 100 %.

Полученные материалы обработаны статистически с использованием непараметрических методов и многофакторного логлинейного анализа. На основании оценки по четырехпольной таблице по χ^2 -критерию Пирсона установлено, что между результатами, полученными с помощью различных методов, значимое отличие отсутствует ($p < 0,05$); логлинейный анализ также свидетельствовал об этом. Проведенный корреляционный анализ указывает на наличие умеренных прямых достоверных связей между показателями.

Следует отметить, что расхождение результатов наблюдалось в 10 случаях. Причем, в 8 из них по данным ГРВ результаты были положительны, а по иммунологическим тестам, наоборот – отрицательны. Нельзя исключить, что это

может быть следствием более высокой чувствительности ГРВ метода, учитывая его способность давать интегральную (суммарную) оценку нарушениям в различных звеньях иммунной системы, то есть по большему числу изменений в иммунной системе. Вместе с этим, отрицать категорично гипердиагностику тоже не представляется возможным. Но, если ее и признать, она столь незначительна (15 % от всех исследованных проб), что, как нам представляется, не противоречит основному выводу о перспективности нового предназначения ГРВ-метода для детекции этиологии аллергических заболеваний.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В итоге сравнительного анализа результатов исследования крови больных аллергией, полученных с помощью ГРВ-графии и общепризнанных иммунологических методов выявлена достаточно высокая частота их совпадения – в 81 % случаев. Представленные материалы позволяют считать, что ГРВ можно отнести к числу перспективных методов определения этиологии аллергий.

Следует обратить внимание, что при отсутствии совпадения результатов метод ГРВ давал преимущественно (в 80 % случаев – в 8 из 10) положительные ответы, а иммунологические тесты – отрицательные. На этом основании авторы высказывают предположение о большей чувствительности и диагностической эффективности предлагаемого приборного метода. Гипотеза, безусловно, нуждающаяся в дальнейшей проверке, обоснована способностью ГРВ-графии, в отличие от классических тестов, оценивать суммарно многие эффекты взаимодействия причинно значимого аллергена с заинтересованными в иммунологическом процессе факторами крови.

Представленные материалы позволяют заключить, что метод ГРВ позволяет выявлять специфическую реакцию антител с комплементарным к ним антигеном, именуемой реакцией агглютинации. В основе метода лежит регистрация динамики показателей газоразрядного свечения во времени – от момента соединения (смешивания) специфических компонентов, каковыми являются антиген и антитела к нему, к моменту завершения их взаимодействия и образования так называемых иммунных комплексов. В результате такого взаимодействия происходит изменение

физико-химических характеристик исследованного материала и, как следствие, показателей ГРВ-грамм.

Полученные результаты, безусловно, имеют предварительный характер и нуждаются в дальнейшем уточнении. Но уже сейчас важность этого направления научного поиска представляется очевидной.

Метод может найти применение для исследования непрозрачных биологических жидкостей, когда постановка реакции агглютинации в классическом исполнении (с визуальным учетом результатов) не только затруднена, но и невозможна – например, исследование крови с целью выявления этиологии аллергий у человека.

ЛИТЕРАТУРА

1. Хаитов Р.М. (ред.) Иммунопатология и аллергология. Алгоритмы диагностики и лечения.- М.:ГЕОТАР-Мед.-2003.- 564 с.
2. Общая аллергология. Под ред. Г.Б.Федосеева.- СПб., 2001., т.1.- 816 с.
3. Ильина Н.И. Эпидемия аллергии – в чем причина? Российский аллергологический журнал.- 2004.- №1.- С. 37-41.
4. Коротков К.Г. Основы ГРВ биоэлетрографии, С-Пб, изд. ИТМО (ТУ), 2001, 356 с.
5. Korotkov K., Korotkin D. Concentration dependence of gas discharge around drops of inorganic electrolytes. J of Applied Physics, 2001.-V. 89. №9, pp.4732-4737.
6. Korotkov K., Krizhanovsky E., Borisova M., Korotkin D. et.al. Time dynamics of the gas discharge around drops of liquids, J.Appl.Phys.- 2004.- V.95 – p.3334-3338.
7. Коротков К.Г., Струков Е.Ю., Широков Д.М. Метод газоразрядной визуализации (ГРВ) в практике врача-исследователя: Методическое пособие.- СПб., 2003.- 40 с.

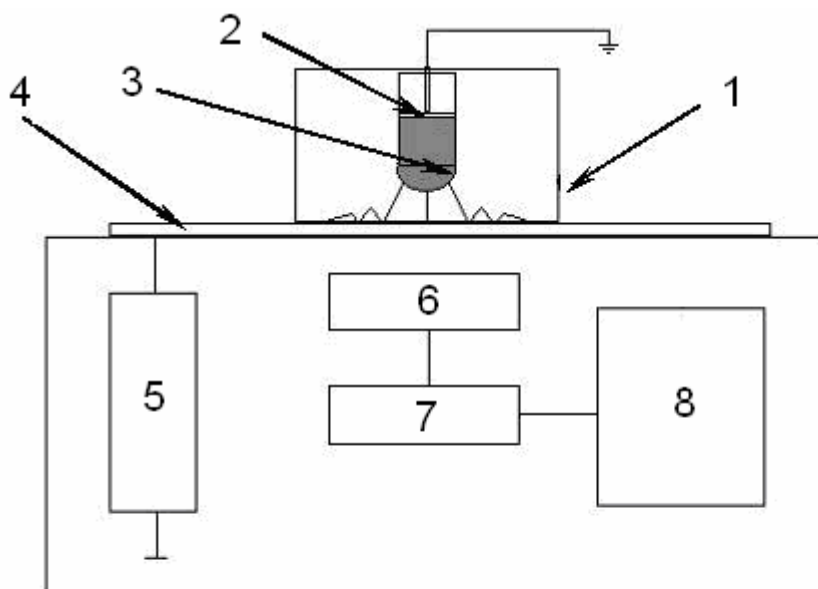


Рис. 1. Блок-схема экспериментальной установки

1. Светозащитный кожух;
2. Дозатор с исследуемой жидкостью, шток дозатора заземлен;
3. Капля жидкости;
4. Полупрозрачная диэлектрическая пластина;
5. Генератор импульсов;
6. Оптическая система;
7. Блок преобразования сигналов;
8. Компьютер.

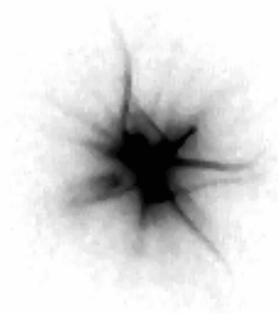


Рис.2. ГРВ-грамма капли раствора исходная и после очистки фона.

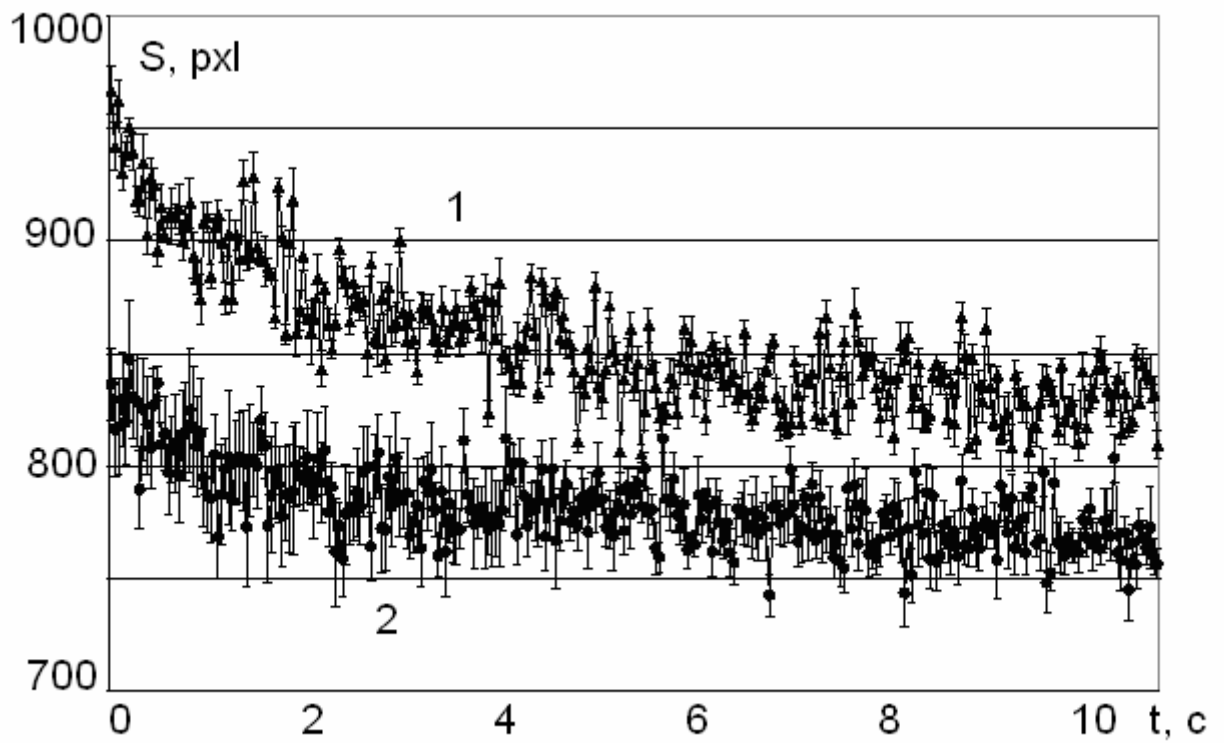


Рис.3. Динамические кривые площади ГРВ-грамм образцов крови с разводящей жидкостью (1) и потенциальным аллергеном (2). Усреднение по 10 измерениям.