

УДК 681,78:616-071

А. В. Степанов, д-р мед. наук, профессор,

Л. П. Свиридов, д-р мед. наук, профессор,

Г. Г. Ахметели, канд. мед. наук,

Р. Р. Юсубов,

«Биотехнопрогресс», Санкт-Петербург

К. К. Коротков, д-р тех. наук, профессор

Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт физической культуры

Метод этиологической диагностики аллергии путем анализа параметров стимулированного свечения крови

Ключевые слова: диагностика, аллергия, метод газоразрядной визуализации, ГРВ, стимулированное свечение крови, биоэлектрография

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 — 81 %. Представленные материалы демонстрируют перспективность развитого метода для определения этиологии аллергии.

Введение

Уже в течение нескольких десятилетий отмечается неуклонный рост числа аллергических заболеваний. Как свидетельствуют публикации, в настоящее время этим недугом страдает каждый третий-четвертый житель планеты [1, 2]. Не случайно в аллергологии введено такое понятие, как «эпидемиология аллергий», что подразумевает, что скорость распространения и широта охвата сопоставимы 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 ГРВграмм [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 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

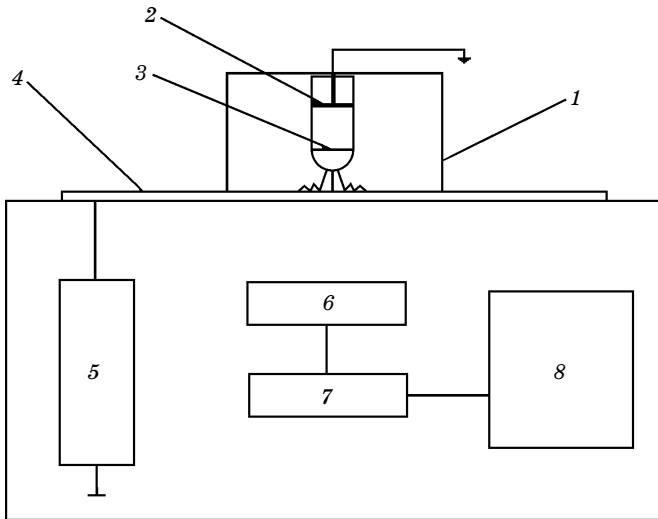


Рис. 1 Блок-схема экспериментальной установки:
 1 — светозащитный кожух; 2 — дозатор с исследуемой жидкостью, шток дозатора заземлен; 3 — капля жидкости; 4 — полупрозрачная диэлектрическая пластина; 5 — генератор импульсов; 6 — оптическая система; 7 — блок преобразования сигналов; 8 — компьютер

зазоре между поверхностью капли и пластиной. Зазор составлял 3 мм.

Использовался серийно выпускаемый прибор «ГРВ Камера» (производитель ООО «Биотехпрогресс» www.ktispsb.ru). Из каждой пробы записывали ГРВ-граммы для 10 капель с частотой 30 кадров в секунду и продолжительностью воздействия электромагнитного поля 10 с. 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 рассу-

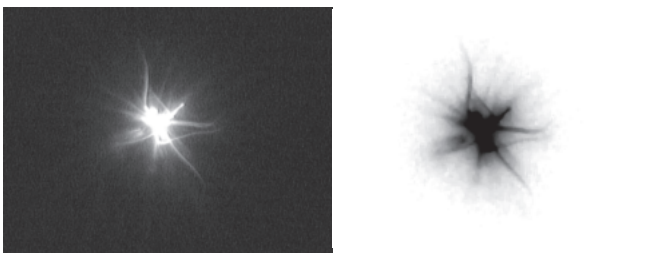


Рис. 2 ГРВ-грамма капли раствора исходная и после очистки фона

ваться. 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 $b(i, j) \geq m$ и $p_{ij} = 0$, если $b(i, j) < m$; $b(i, j)$ — значение яркости элемента изображения (пикселя); m — 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 $b(x, y) = i$, $i (0, 250)$.

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 значения 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 подготовки проб

Гепаринизированную кровь пациента разливали в четыре стерильные пробирки по 0,25 мл. В две из них (контрольные) вносили по 0,05 мл раз-

водящей жидкости, изготавливаемой производителями стандартных диагностических аллергенов (применялись препараты производства ОАО «Биомед» им. И. И. Мечникова); в две другие (опытные) — вносили в том же объеме потенциальный аллерген. Количество опытных проб крови определяется количеством подозреваемых (по данным анамнеза) аллергенов (один аллерген — две опытные пробы, два аллергена — четыре опытные пробы и т. д.). Затем пробы инкубировались: половину в течение 1,5 ч при 37 °С 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 сенсибилизированными к нему клетками происходят: образование иммунных комплексов, повреждение мембран и распад форменных элементов, выход из них биологически активных веществ и другие процессы, влекущие 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 ГРВграфии.

Техника ГРВграфии

После экспозиции кровь (15 мкл) наносилась дозатором на датчик прибора и записывали показания в течение 10 с при стандартном режиме экспозиции. В каждой пробе исследовались 10–12 капель и результаты усредняли. Информацию обрабатывали в программном ГРВ-комплексе. Для каждой ГРВ-граммы вычисляли площадь свечения, коэффициент формы, средний радиус изолинии, длину изолинии, энтропию по изолинии, среднюю интенсивность. По результатам, полученным на образцах, выдержанных 1,5 и 24 ч, делали 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, т. е. 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), до-

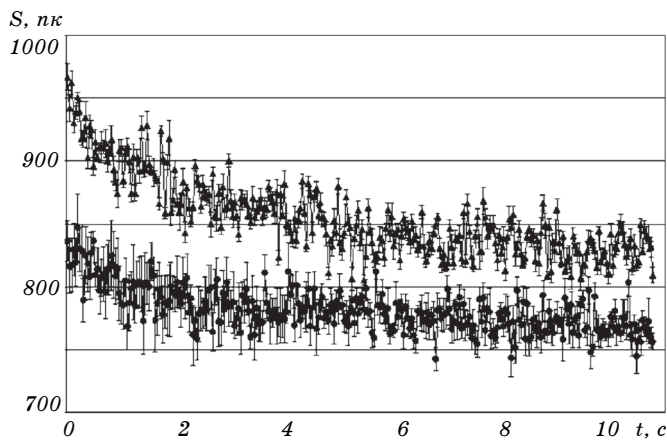


Рис. 3 Динамические кривые площади ГРВ-грамм образцов крови с разводящей жидкостью (1) и потенциальным аллергеном (2). Усреднение по 10 измерениям

машней 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 и иммуноферментный анализ. О достоверности информации ГРВграфии судили по частоте совпадения ее результатов с данными общепринятых иммунологических исследований. Общий итог анализа представлен в таблице.

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

Таблица		Результаты выявления этиологически значимых аллергенов с помощью газоразрядной визуализации и общепринятых иммунологических тестов	
Аллерген	Количество проб в группах	Количество совпадений, %	
Перо подушки	14	78	
Домашняя пыль	19	79	
Клещ <i>D. pteronissynus</i>	14	78	
Белок куриного яйца	5	100	
Мясо утки	1	100	
<i>Всего исследовано проб</i>		53	
<i>Общее количество совпадений, %</i>		81	

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 свидетельствует 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 из-за его способности давать интегральную (суммарную) оценку нарушениям в различных звеньях иммунной системы, т. е. по большому числу изменений в иммунной системе. Вместе с этим отрицать категорично гипердиагностику тоже нельзя. 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 ГРВграфии и общепризнанных иммунологических методов выявлена достаточно высокая частота их совпадения — 81 %. 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 ГРВграфии, 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 методом ГРВ можно 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, до момента завершения их взаимодействия и образования так называемых иммунных комплексов. В результате такого взаимодействия изменяются физико-химические характеристики исследованного материала и, как следствие, показатели ГРВграмм.

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 для исследования крови в целях выявления этиологии аллергий у человека.

Литература

1. **Хайтов Р. М.** Иммунопатология и аллергология. Алгоритмы диагностики и лечения. М.:ГЕОТАР-Мед, 2003. 564 с.
2. **Общая аллергология/Под ред. Г. Б. Федосеева.** СПб.: Нормед-издат, 2001. Т. 1. 816 с.
3. **Ильина Н. И.** Эпидемия аллергии — в чем причина?//Рос. аллергол. жур. 2004, № 1. С. 37–41.
4. **Коротков К. Г.** Основы ГРВ биоэлетрографии. СПб.: 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, vol. 89, № 9. P. 4732–4737.
6. **Time dynamics of the gas discharge around drops of liquids/К. К о r o t k o v, Е. К r i z h a n o v s k y, М. В o r i s o v a, et. al.//J. of Applied Physics/ 2004, vol. 95 P. 3334–3338.**
7. **Коротков К. Г., Струков Е. Ю., Широков Д. М.** Метод газоразрядной визуализации (ГРВ) в практике врача-исследователя: Метод. пособие. СПб.: ГУСПБИТМ 2003. 40 с.