

# ЭОЗИНОФИЛЬНЫЙ КАТИОННЫЙ ПРОТЕИН КАК МАРКЕР АЛЛЕРГИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ НОСА

Мокроносова М.А., Тарасова Г.Д., Протасов П.Г.,  
Смольникова Е.В., Сергеев А.В.

*Лаборатория иммунологии, биохимии и микологии, Государственное учреждение Федеральный научно-клинический центр оториноларингологии Росздрава, Москва*

**Резюме.** В патогенезе поздней фазы аллергического воспаления слизистой носа эозинофилам отводят ведущую роль. В работе было проведено определение уровней эозинофилов в назальном секрете у 33 больных персистирующим аллергическим ринитом (ПАР) и 25 пациентов с хроническим инфекционным ринитом (ХИР), а также уровней эозинофильного катионного протеина (ЕСР) в назальном секрете и сыворотке крови, и определена диагностическая значимость этих показателей. Содержание эозинофилов в назальном секрете определяли с помощью эксфолиативного цитологического анализа. Забор назального секрета у пациентов проводили абсорбционным методом. Стандартизация образцов проводилась в соответствии с концентрацией мочевины в назальном секрете и сыворотке крови. Уровни ЕСР в назальном секрете и сыворотке крови были определены иммунохемилюминесцентным методом (UniCAP 100, Phadia, Швеция). Средний уровень эозинофилов в назальном секрете у больных ПАР был в 4,6 раз выше, чем у пациентов с ХИР. Средние значения концентрации ЕСР в сыворотке крови и назальном секрете в группе больных ПАР составили  $30,5 \pm 28$  мкг/л и  $402,7 \pm 326,9$  мкг/л соответственно. В группе больных ХИР —  $12,4 \pm 11,5$  мкг/л и  $86,9 \pm 137,4$  мкг/л. Различия были достоверными ( $p < 0,05$ ). Взаимосвязи между концентрацией ЕСР в сыворотке крови и назальном секрете и между количеством эозинофилов и уровнем ЕСР в назальном секрете не было выявлено. Наибольшей чувствительностью обладал метод определения концентрации ЕСР в назальном секрете, наибольшей специфичностью — метод определения содержания эозинофилов в назальном секрете. Уровень ЕСР в назальном секрете характеризует активную фазу аллергического воспаления и может быть использован как количественный параметр оценки тяжести течения ПАР.

*Ключевые слова:* эозинофильный катионный протеин, аллергический ринит, назальный секрет.

*Mokronosova M.A., Tarasova G.D., Protassov P.G., Smol'nikova E.V., Sergeev A.V.*

## EOSINOPHILIC CATIONIC PROTEIN AS A MARKER OF ALLERGIC INFLAMMATION OF NASAL MUCOSA

**Abstract.** Eosinophils are regarded as major cell population directly involved into late phase of allergic inflammation of nasal mucosa. We performed a comparative study, measuring the amounts of eosinophils and eosinophilic cationic protein (ECP) in nasal secretions and serum samples of thirty-three patients with persistent allergic rhinitis (PAR), and twenty-five persons with chronic infectious rhinitis (CIR), to determine diagnostic significance of these parameters. Eosinophil counts in nasal secret were carried out by exfoliative cytology analysis. Sampling of nasal secretions was performed by absorption method. The samples were standardized by concentration of urea in nasal secretions and sera. ECP levels in nasal secretions and serum were determined by chemiluminescence assays (UniCAP 100, Phadia, Sweden).

Mean scores of eosinophils in nasal secret of PAR patients were 4.6 times higher, than in the patients with CIR. Median ECP values in serum and nasal

### **Адрес для переписки:**

*Сергеев Андрей Викторович*  
117485, Москва, ул. Бутлерова, 10, 208.  
Тел.: +7 (495) 336-79-54, 917-08-91.  
Факс: +7 (495) 917-49-00.  
E-mail: avsergeyev@yandex.ru

secretions of PAR patients were, resp.,  $30.5 \pm 28.0 \mu\text{g/l}$  and  $402.7 \pm 326.9 \mu\text{g/l}$ . In patients with CIR, ECP values were  $12.4 \pm 11.5 \mu\text{g/l}$  in serum and  $86.9 \pm 137.4 \mu\text{g/l}$  in nasal secretions. The appropriate differences have been significant ( $p < 0.05$ ). No correlations were found between ECP levels in serum and nasal secretions, as well as between ECP levels and eosinophil counts in nasal secretions. The technique of ECP determination in nasal secretions was the most sensitive approach, whereas counting of eosinophils proved to be the most specific method. ECP levels in nasal secretions well characterize an active phase of allergic inflammation and may be used as quantitative parameter for estimation of PAR severity. (*Med. Immunol.*, 2007, vol. 9, N 4-5, pp 467-472)

## Введение

Персистирующий аллергический ринит (ПАР) — хроническое заболевание слизистой оболочки полости носа, в основе которого лежит иммунологически обусловленная реакция гиперчувствительности слизистой оболочки полости носа на ингаляционные аллергены. Дифференциальная диагностика ПАР часто бывает затруднительной. Это связано с тем, что, во-первых, ПАР часто осложняется инфекционными заболеваниями верхних дыхательных путей. Во-вторых, необходимо отличать ПАР от многих сходных по клинической симптоматике заболеваний. В этой связи разработка методов диагностики ПАР весьма актуальна. В патогенезе ПАР особая роль принадлежит локальному накоплению эозинофилов, провоспалительных цитокинов, хемокинов и экспрессии молекул межклеточной адгезии на эндотелий кровеносных сосудов в области воспаления [4, 8, 21]. Существуют объективные маркеры аллергического воспаления, обнаруживаемые как в сыворотке крови, так и в назальном секрете и мокроте, уровень которых определяет степень поражения дыхательных путей [5]. К таковым относят эозинофилию, повышение уровня эозинофильного катионного протеина (ЕСР), триптазы, лейкотриенов и некоторых других медиаторов воспаления [2, 5, 8, 13]. ЕСР является объективным маркером активации эозинофилов. Он составляет 70% от всех белков, продуцируемых эозинофилами, стимулирует секрецию слизи, тормозит пролиферацию Т-лимфоцитов, действует на свертываемость крови, обладает цитотоксичностью [3, 7, 15].

Цель работы: оценить диагностическое значение показателей концентрации ЕСР в сыворотке и назальном секрете и проанализировать зависимость между концентрациями ЕСР и содержанием эозинофилов в назальном секрете больных ПАР.

## Материалы и методы

Были исследованы образцы сыворотки крови и назального секрета от 33 больных ПАР и 25 пациентов с диагнозом «хронический инфекционный ринит (ХИР) в стадии обострения забо-

левания». Возраст пациентов варьировал от 3 до 58 лет. На момент обследования ни один из пациентов не получал какую-либо терапию. Для диагностики ПАР использовали анкету «The Score for Allergic Rhinitis», основанную на количественной системе подсчета в баллах и позволяющую выявить не только аллергический ринит, но и некоторые особенности данного диагноза: сезонность, сенсibiliзирующий фактор, тяжесть клинических проявлений [11]. Верификацию диагноза ПАР проводили согласно общепринятым стандартам диагностики на основании клинической картины заболевания, аллергологического анамнеза, данных кожного тестирования с основным набором аэроаллергенов. При обследовании пациентов с ХИР признаков аллергии выявлено не было.

Забор назального секрета у пациентов проводили абсорбционным методом с помощью тампонов из полиакрилонитрильного волокна, которые затем помещали в 1 мл 2,7% раствора динатриевой соли этилендиаминаотетрауксусной кислоты ( $\text{pH} = 7,4$ ), и центрифугировали при 1000 об/мин в течение 15 минут для осаждения целых клеточных элементов [1, 6, 17]. Супернатант использовался в качестве исследуемого материала. Содержание ЕСР в назальном секрете и сыворотке крови пациентов исследуемых групп проводили иммунохемилюминесцентным методом на приборе «UniCAP 100» (Phadia, Швеция) с применением реагентов для определения ЕСР в сыворотке.

Стандартизацию образцов проводили в соответствии с концентрацией мочевины в назальном секрете и сыворотке крови [1, 20]. Уровень мочевины определяли на автоматическом биохимическом анализаторе «Сапфир 400» уреазным-глутаматдегидрогеназным методом с использованием реактивов фирмы «DiaSys Diagnostic Systems GmbH & Co KG» (Германия).

Вычисление содержания ЕСР рассчитывали по формуле:  $X = A \times C/B$ , где  $X$  — количество искомого ЕСР в образцах назального секрета (мкг/л),  $A$  — концентрация мочевины в сыворотке крови (моль/л),  $B$  — концентрация мочевины в назальном секрете (моль/л),  $C$  — концентрация

ЕСР, полученная при исследовании образца назального секрета (мкг/л).

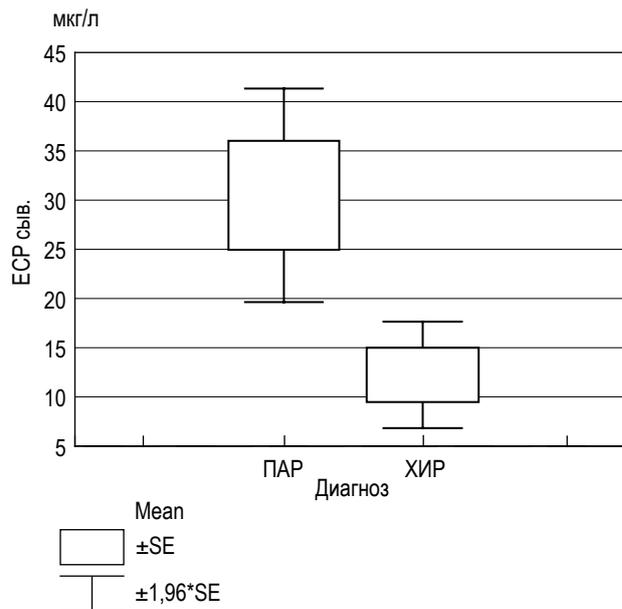
Клеточный состав назального секрета оценивали с помощью эксфолиативного цитологического анализа [9, 10]. Мазок содержимого полости носа на стекле высушивали при комнатной температуре и фиксировали в метиловом спирте в течение 10 мин. Препарат окрашивали отдельно: сначала водным раствором эозина К (1 г/л), затем водным раствором азура (1 г/л). После просушивания мазок изучали под световым микроскопом с 90-кратным увеличением с иммерсией. В мазке подсчитывали не менее 200 клеточных элементов. Определяли процентное содержание эпителиальных клеток, лимфоцитов, нейтрофильных и эозинофильных лейкоцитов, оценивали состояние клеточных элементов – изменения мембраны, цитоплазмы, ядра, а также морфологию эпителия.

Была проведена оценка диагностической эффективности определения ЕСР в сыворотке и в назальном секрете и уровня эозинофилов в эксфолиативном цитологическом анализе назального секрета. Оценивались показатели чувствительности методов (способности выявлять аллергический генез ринита среди больных именно с этой патологией), специфичности методов (способности идентифицировать риниты инфекционного генеза) и вероятности правильного диагноза у больных с ПАР.

## Результаты

На рисунке 1 представлены результаты по определению ЕСР в сыворотке крови у пациентов исследуемых групп. Величина концентрации ЕСР в группе больных ПАР варьировала от 3,4 до 90,5 мкг/л, среднее значение составило  $(30,5 \pm 28)$  мкг/л, а в группе больных ХИР этот показатель колебался в диапазоне от 2,9 до 51,7 мкг/л при среднем значении  $(12,4 \pm 11,5)$  мкг/л. Отличие в средних уровнях концентрации ЕСР в сыворотке крови у атопических и неатопических пациентов было достоверным ( $p < 0,05$ ). На рисунке 2 представлены показатели содержания ЕСР, выявленные в назальном секрете больных ПАР и ХИР. Полученные значения ЕСР находились в диапазоне от 4,7 до 1477,2 мкг/л. Среднее значение составило  $402,7 \pm 326,9$  мкг/л в группе пациентов с ПАР и достоверно превышало таковое в группе неатопических пациентов, где оно соответствовало  $86,9 \pm 137,4$  мкг/л ( $p < 0,05$ ).

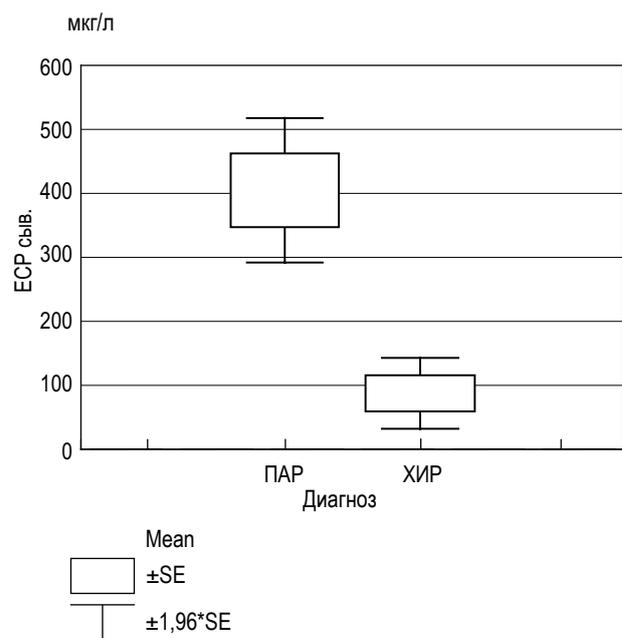
С целью исследования зависимости между локальной и системной активацией эозинофилов было проведено сравнение показателей ЕСР в сыворотке крови и назальном секрете. Взаимосвязи между концентрацией ЕСР в сы-



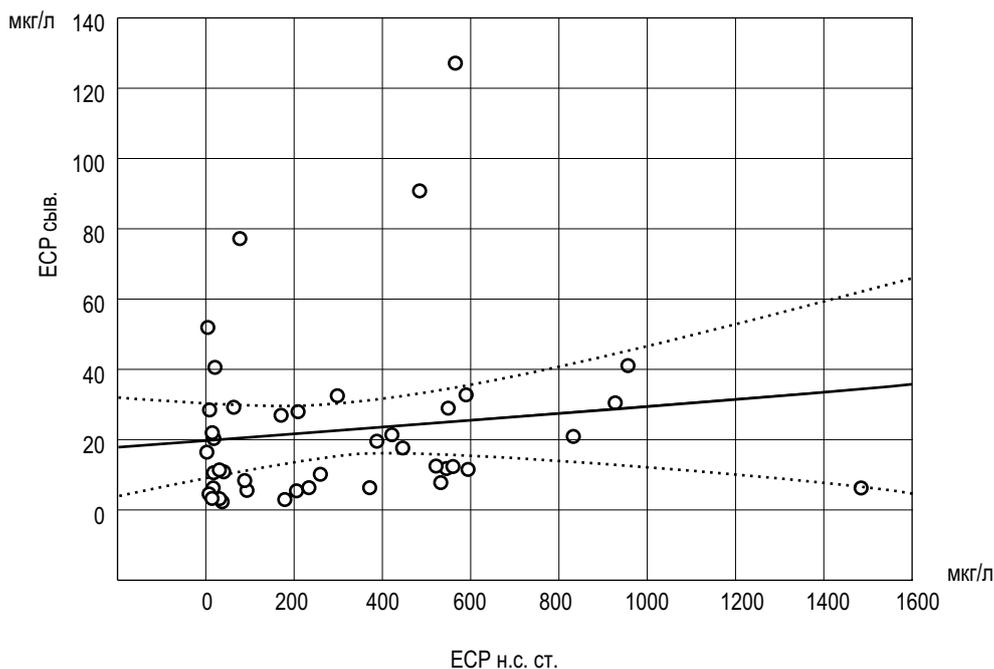
**Рисунок 1. Содержание ЕСР в сыворотке крови больных ПАР и ХИР**

воротке крови и назальном секрете выявлено не было. При проведении анализа корреляции данных признаков по Спирмену отсутствие взаимосвязи было подтверждено  $r = 0,23$  ( $p > 0,05$ ) (рис. 3).

При анализе связи между количеством эозинофилов и уровнем ЕСР в назальном секрете было выявлено отсутствие зависимости между этими параметрами  $r = 0,28$ ;  $p > 0,05$ , хотя и прослеживалась положительная тенденция во взаимосвязи этих признаков (рис. 4).



**Рисунок 2. Содержание ЕСР в назальном секрете больных ПАР и ХИР**

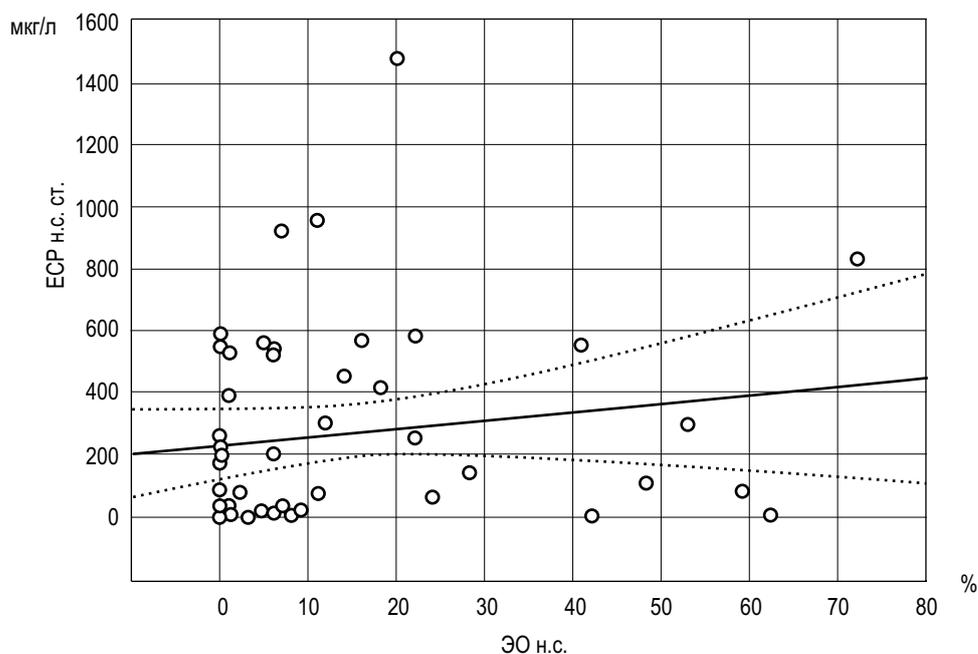


**Рисунок 3. Взаимосвязь между уровнем ЕСР в назальном секрете и сыворотке крови**

В таблице 1 представлена сравнительная характеристика показателей диагностической эффективности методов определения ЕСР в сыворотке и в назальном секрете и уровня эозинофилов в эксфолиативном цитологическом анализе назального секрета. Как видно, наибольшая чувствительность оказалась у метода определения концентрации ЕСР в назальном секрете. Наибольшая специфичность выявлена при опре-

делении содержания эозинофилов в назальном секрете.

На рисунке 5 представлена сравнительная характеристика апробированных методов диагностики у двух групп пациентов – атопических и неатопических. Частота повышенных значений уровня эозинофилов в назальном секрете в группе больных ПАР была 44%, а в группе с ХИР – 11% ( $p < 0,05$ ). Высокие значения concentra-



**Рисунок 4. Взаимосвязь между количеством эозинофилов и концентрацией ЕСР в назальном секрете**

ТАБЛИЦА 1. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАТИВНОСТИ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЕСР И ЭОЗИНОФИЛОВ

Методы / Характеристика	Определение ЕСР в сыворотке крови	Определение ЕСР в назальном секрете	Определение эозинофилов в назальном секрете
Чувствительность	65,4%	87,9%	43,9%
Специфичность	72,2%	72,0%	88,9%
Вероятность	77,3%	80,5%	94,7%

ции ЕСР в сыворотке крови были обнаружены в 65,4% случаев у больных ПАР и в 27,8% случаев у пациентов с ХИР ( $p < 0,05$ ). Частота повышенных значений концентрации ЕСР в назальном секрете у исследуемой группы составила 87,9%, а у группы сравнения – 28% ( $p < 0,05$ ).

## Обсуждение

Поиск адекватных, доступных, легковоспроизводимых, неинвазивных методов диагностики ПАР представляет собой актуальную проблему [18]. ПАР – заболевание, протекающее волнообразно в течение многих лет. Для этой патологии характерно наличие острой и хронической фаз воспаления, обострений и ремиссий. Проблема стандартизации метода получения и исследования образцов назального экссудата осложняется тем, что в каждом случае на разных этапах заболевания наблюдается ринорея различной интенсивности, и концентрация белков в секрете существенно варьирует [12]. Для получения достоверных и сравнимых результатов была осуществлена процедура стандартизации образцов назального секрета по концентрации мочевины (в соответствии с таковой в сыворотке крови). В соответствии

с определением концентрации мочевины была вычислена концентрация ЕСР.

Аллергическое воспаление полости носа характеризуется, прежде всего, инфильтрацией ткани слизистой оболочки полости носа эозинофилами [14]. Один из наиболее токсичных белков, составляющий наибольший удельный вес в эозинофильных гранулах, – ЕСР [16, 19]. Среднее значение концентрации ЕСР в сыворотке крови в группе больных ПАР в 2,5 раза превышало таковой показатель у больных в группе сравнения, а среднее значение концентрации ЕСР в назальном секрете в группе больных ПАР было в 3,1 раз выше, чем у пациентов с ХИР.

При сравнении диагностической значимости определения концентрации ЕСР в сыворотке крови и назальном секрете, оказалось, что второй метод наиболее чувствительный, т.е. этот факт свидетельствует о выраженном локальном аллергическом воспалении в полости носа, при отсутствии системного.

Средний уровень эозинофилов в назальном секрете у больных ПАР был в 4,6 раз выше, чем у пациентов с ХИР. Однако, не было найдено зависимости между количеством содержания эозинофилов и уровнем ЕСР в назальном секрете. Это говорит о том, что эозинофилы в назальном секрете могут находиться в неактивном состоянии и не участвовать в аллергическом воспалении.

Таким образом, определение уровня ЕСР в назальном секрете представляет собой высокочувствительный метод, характеризующий активную фазу аллергического воспаления, который можно использовать как количественный параметр оценки тяжести течения ПАР. Единственным недостатком этого метода является его высокая стоимость.

## Список литературы

1. Хмельницкая Н.М., Рязанцев С.В., Клячко Л.Л. и др. Методы изучения и исследования экзокринных секретов для изучения некоторых параметров местного иммунитета // Клинич. лаб. диагностика. – 1997. – № 12. – С. 43-44.
2. Balfor-Linn I. Quantitative evaluation of nasal mucosa proteins // Clin. Exp. Allergy. – 1999. – Vol. 29, N 5. – P. 719-720.

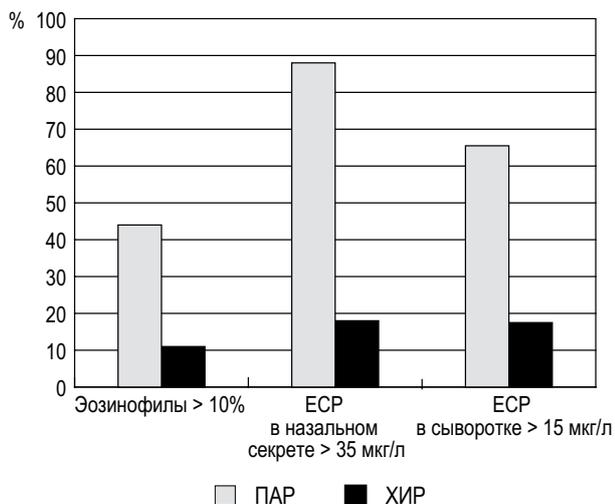


Рисунок 5. Частота выявления высоких уровней содержания эозинофилов и ЕСР у больных ПАР и ХИР

3. Bernardini R., Novembre E., Mugnaini L., Rossi M.E., Vierucci A. Eosinophil cationic protein and tryptase in the nasal lavage fluid of children with grass-pollen rhinitis: levocabastine effect // *Allergy Asthma Proc.* – 1998. – Vol. 19, N 2. – P. 75-80.
4. Bousquet J., Vignola A.M., Campbell A.M., Michel F.B. Pathophysiology of allergic rhinitis // *Int. Arch. Allergy Immunol.* – 1996. – Vol. 110. – P. 207-218.
5. Durham S.R. Mechanisms of mucosal inflammation in the nose and lungs // *Clin. Exp. Allergy.* – 1998. – Vol. 28, N 2. – P. 11-16.
6. Frischer T., Baraldi E. Upper airway sampling // *Am. J. Respir. Crit. Care.* – 2000. – Vol. 162, N 2. – P. 28-30.
7. Frischer T., Halmerbauer G., Gartner C., Rath R., Tauber E., Schierl M., Koller D.Y., Urbanek R., Forster J., Kuhr J. Eosinophil-derived proteins in nasal lavage fluid of neonates of allergic patients and the development of respiratory symptoms during the first 6 months of life // *Allergy.* – 2000. – Vol. 55, N 8. – P. 773-777.
8. Garrelds I., De Graaf-in't Veld T., Nahori M., Vargaftig B.B., Gerth van Wijk R., Zijlstra F.J. Interleukin-5 and eosinophil cationic protein in nasal lavages of rhinitis patients // *Eur. J. Pharmacol.* – 1995. – Vol. 275, N 3. – P. 295-300.
9. Jankowski R., Persoons M., Foliguet B., Coffinet L., Thomas C., Verient-Montaut B. Eosinophil count in nasal secretions with and without nasal symptoms // *Rhinology.* – 2000. – Vol. 38, N 1. – P. 23-32.
10. Jean R., Delakourt C., Rufin P., Pfister A., Waernessyckle S., de Blic J., Scheinmann P. Nasal cytology in rhinitis children: comparison between brushing and blowing the nose // *Allergy.* – 1997. – Vol. 51, N 12. – P. 932-934.
11. Juniper E.F., Guyatt G.H., Dolvich J. Assessment of quality of life in adolescents with allergic rhinoconjunctivitis: development and testing of a questionnaire for clinical trials // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 1994. – Vol. 93. – P. 413-423.
12. Klimek L., Rasp G. Norm values for eosinophil cationic protein in nasal secretions: influence of specimen collection // *Clin. Exp. Allergy.* – 1999. – Vol. 29, N 3. – P. 367-374.
13. Lee H.S., Majima Y., Sakakura Y., Shino-gi J., Kawaguchi S., Kim B.W. Quantitative cytology of nasal secretions under various conditions // *Laryngoscope.* – 1993. – Vol. 103, N 5. – P. 533-537.
14. Lonkvist K., Moshfegh A., Pedroletti C., Hedlin G., Hallden G., Lundahl J. Increased eosinophil transmigration after nasal allergen challenge in children with allergic asthma and rhinitis // *Allergy.* – 2002. – Vol. 57. – P. 1200-1204.
15. Marccuci F., Sensi L.G., Migali E., Coniglio G. Eosinophil cationic protein and specific IgE in serum and nasal mucosa of patients with grass-pollen allergic rhinitis and asthma // *Allergy.* – 2001. – Vol. 56, N 3. – P. 231-236.
16. Rasp G., Thomas P., Bujia J. Eosinophil inflammation of the nasal mucosa in allergic and non-allergic rhinitis measured by eosinophil cationic protein levels in native nasal fluid and serum // *Clin. Exp. Allergy.* – 1994. – Vol. 24, N 12. – P. 1151-1156.
17. Shinogi J., Majima Y., Takeuchi K., Harada T., Sakakura Y. Quantitative cytology of nasal secretions with perennial allergic rhinitis in children: comparison of infected and noninfected conditions // *Laryngoscope.* – 1998. – Vol. 108, N 5. – P. 703-705.
18. Togias A.G. Systemic immunologic and inflammatory aspects of allergic rhinitis // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2000. – Vol. 106. – P. 247-250.
19. Wang D., Clement P., Smitz J., de Waele M., Derde M.P. Monitoring nasal allergic inflammation by measuring the concentration of eosinophil cationic protein and eosinophils in nasal secretions // *Allergy.* – 1995. – Vol. 50, N 2. – P. 147-151.
20. Wang D., Yeoh K. The significance and technical aspects of quantitative measurements of inflammatory mediators in allergic rhinitis // *Asian. Pac. J. Allergy Immunol.* – 1999. – Vol. 17, N 3. – P. 219-228.
21. Wilson S.J., Lau L., Howarth P.H. Inflammatory mediators in naturally occurring rhinitis // *Clin. Exp. Allergy.* – 1998. – Vol. 28. – P. 220-227.

поступила в редакцию 24.11.2006

принята к печати 30.01.2007