

© ТИТОВА Н.Д., 2010

## СЕНСИБИЛИЗАЦИЯ ГРАНУЛОЦИТОВ К ПИЩЕВЫМ КРАСИТЕЛЯМ У БОЛЬНЫХ С АЛЛЕРГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

ТИТОВА Н.Д.

*Белорусская медицинская академия последипломного образования*

**Резюме.** Диагностика побочных реакций на пищевые добавки затруднена в связи с многообразием механизмов, участвующих в их реализации, и отсутствием достаточно достоверных методов их определения. Проведено обследование 114 больных с аллергическими заболеваниями, все были обследованы клинически и лабораторно с применением реакции антигениндуцированного повреждения лейкоцитов (РАПЛ) и реакции выброса миелопероксидазы гранулоцитами (РВМ) для диагностики непереносимости пищевых красителей. Наиболее часто выявлялась повышенная чувствительность лейкоцитов обследуемых к красному красителю кармуазину – у 11 из 114 пациентов по данным РАПЛ и у 9 из 83 по данным РВМ. Положительные результаты тестов к желтым красителям – тартразину и солнечному желтому по данным РАПЛ были у 7 и 9 пациентов из 114 соответственно и у 7 и 4 из 83 по данным РВМ.

Практическое применение предлагаемых методов позволит повысить точность диагностики аллергии к пищевым красителям.

**Ключевые слова:** *пищевые красители, сенсibilизация гранулоцитов, аллергические заболевания.*

**Abstract.** Diagnosing of adverse reactions to food additives is difficult due to a wide variety of mechanisms involved in their implementation and lack of sufficiently reliable methods for their determination. We examined 114 patients with allergic diseases, all of them were examined clinically and laboratorially using the reaction of antigen induced damage of leukocytes (ADL) and the test of the release of myeloperoxidase (TRM) from granulocytes for the diagnosis of intolerance towards food dyes. Increased sensitivity of leukocytes to red dye azorubine was detected most frequently – in 11 out of 114 patients according to ADL and in 9 out of 83 patients according to TRM. Positive test results for yellow dyes – tartrazine and sunset yellow according to ADL were obtained in 7 and 9 out of 114 patients, respectively, and 7 and 4 out of 83 patients according to TRM. Practical application of the proposed methods will improve the accuracy of the diagnosis of allergy to food dyes.

Автор благодарит заведующую аллергологическим отделением Витебской областной клинической больницы Захарову Ольгу Вячеславовну и лаборанта клинической иммунологической лаборатории Куликову Зинаиду Игнатьевну за помощь при выполнении исследований.

**Б**ольшое влияние на состояние организма человека и развитие патологии оказывают продукты питания, входящие в ежедневный рацион потребления, а точнее – их качество и состав, который изобилует пи-

щевыми добавками. К *пищевым добавкам* относятся идентичные природным или синтетические вещества, увеличивающие сроки хранения продуктов или придающие им заданные свойства – определённый цвет (красители), аромат (ароматизаторы), увеличивающие длительность хранения (консерванты), изменяющие вкус и консистенцию (усилители вкуса, загустители, стабилизаторы, эмульгаторы и др.) [1, 2]. Буква «Е» на этикетке состава того или иного продукта питания обозначает со-

*Адрес для корреспонденции:* 220013, г. Минск, ул. П. Бровки, 3, корп. 3, Белорусская медицинская академия последипломного образования, кафедра аллергологии и профпатологии, тел. 8-029-718-716-2 (МТС), (017) 268-74-71, e-mail: nadytitova@mail.ru. – Титова Н.Д.

ответствие европейскому стандарту питания, а цифровой индекс – сам вид добавки. Код, начинающийся на 1, означает красители; на 2 – консерванты, на 3 – антиокислители (они предотвращают порчу продукта), на 4 – стабилизаторы (сохраняют его консистенцию), на 5 – эмульгаторы (поддерживают структуру), на 6 – усилители вкуса и аромата, на 9 – антифламинговые, противопенные вещества. Индексы с четырехзначным номером говорят о наличии подсластителей – веществ, сохраняющих рассыпчатость сахара или соли, глазирующих агентов [1, 2, 3].

В пищевой промышленности широко используются пищевые красители, которые позволяют придать изделиям необходимый цвет или оттенок. В настоящее время в Беларуси допускается использование и присутствие в отечественных и импортных пищевых продуктах около 250 видов пищевых добавок. Минздравом РБ разрешены к применению в пищевой промышленности следующие синтетические красители: желтые – «тартразин» (E102) и «хинолиновый желтый» (E104), солнечный желтый (E110); красные – кармуазин «азорубин» (E122), «понсо 4Р» (E124); синие – «патентованный синий V» (E131), «индигокармин» (E132) и некоторые другие [3].

Одними из наиболее широко используемых красителей являются тартразин (E102), кармуазин (E122), солнечный желтый (E110).

Диагностика побочных реакций на пищевые красители затруднена в связи с многообразием механизмов, участвующих в их реализации, и отсутствием достаточно достоверных методов их определения [4]. По данным исследователей, кожные prick-тесты и аппликационные (patch) тесты к пищевым красителям (тартразину, солнечному желтому, амаранту, бензоату натрия и др.) редко оказываются положительными и не совпадают с данными анамнеза, клиники и перорального тестирования [4, 5, 6]. Вследствие недостатка доступных кожных или *in vitro* тестов диагностика гиперчувствительности к пищевым добавкам в основном базируется на двойном плацебо контролируемом пероральном тестировании [6, 7]. Провокационные тесты являются одними из наиболее досто-

верных методов диагностики, однако они могут привести к развитию тяжелой системной реакции, поэтому их необходимо проводить только в специализированном стационаре. В то же время, провокационные двойные слепые тесты к пищевым добавкам редко оказываются положительными – в среднем 2-3% случаев у пациентов с хронической крапивницей [4, 7].

Механизмы развития побочных реакций к пищевым добавкам различные:

- типичные немедленные и замедленные аллергические реакции;
- псевдоаллергические реакции в связи с прямым действием препаратов на чувствительные клетки, выделяющие медиаторы;
- фармакологические и метаболические эффекты, обусловленные ингибцией простагландинсинтетазы и усилением образования лейкотриенов, что наблюдается при действии аспирина и тартразина;
- активация системы комплемента через альтернативный путь.

Основными методами иммунодиагностики аллергии служат тесты выявления в крови свободных антител различных изотипов прежде всего IgE, а также IgG [7, 8]. Однако известно, что гранулоциты (нейтрофилы, эозинофилы, базофилы) несут на поверхности высоко- и низкоаффинные рецепторы для Fc $\epsilon$ , Fc $\gamma$ , Fc $\alpha$  -фрагментов иммуноглобулинов (Fc-рецепторы), которые связывают и иммуноглобулины-антитела, из-за чего концентрация их в сыворотке крови снижается до неопределяемого уровня [4, 8]. При взаимодействии гранулоцитов, несущих IgE и IgG антитела с соответствующим антигеном или аллергеном, они активируются и могут, во-первых, повреждаться и лизироваться [9], во-вторых, у них повышается проницаемость мембран и базофилы секретируют гранулы, содержащие медиаторы [10], а эозинофилы и нейтрофилы – гранулы с миелопероксидазой и другими ферментами [11]. Поврежденные гранулоциты окрашиваются трипановым синим, а живые нет, что позволяет определять их реакцию на причинные агенты заболевания [9]. С другой стороны, определение медиаторов [10] и ферментов в надосадоч-

ной жидкости лейкоцитов, инкубированных с аллергенами, позволяет оценить результат их реакций [11].

Целью данной работы является оценка возможности применения реакции аллерген-индуцированного повреждения лейкоцитов (РАПЛ) и реакции выброса миелопероксидазы гранулоцитами (РВМ) для выявления сенсibilизации гранулоцитов к пищевым красителям у больных с аллергическими заболеваниями.

### Методы

Обследовано 114 больных с аллергическими заболеваниями: атопическая бронхиальная астма (БА) легкой и средней степени тяжести – 68, атопический дерматит (АД) – 21, сочетание БА и АД – 7, хроническая рецидивирующая крапивница (ХРК) – 18, в возрасте от 18 до 60 лет, из них 73 женщины и 41 мужчина. 90 больных находились на стационарном лечении в аллергологическом отделении Витебской областной клинической больницы, а 24 – в отделении аллергологии и профпатологии 10-й клинической больницы г. Минска. Все больные были обследованы клинически и лабораторно. Они находились в периоде клинической ремиссии, не получали противоаллергической терапии в течение 36 часов, и забор крови для лабораторных исследований проводился до постановки кожных проб. Больные поступали в стационар для уточнения диагноза, выбора тактики дальнейшего лечения, подбора доз препаратов, проведения противорецидивной терапии, прохождения курса реабилитации. Кожные пробы с бытовыми, эпидермальными, пищевыми аллергенами. Выявляли аллергию к одному или нескольким аллергенам у всех больных. Непереносимость пищевых продуктов промышленного производства с наличием в их составе пищевых добавок отмечали 26,3% (30 из 114) обследованных. Учитывались все возможные реакции: тошнота, сыпь, колики, понос, рвота, затруднение дыхания, кашель, зуд на любые окрашенные или консервированные продукты, напитки, мороженое, шоколад, конфеты, йогурты и др. Контрольную группу сравнения составили 25 доноров.

Для выявления IgE и IgG – зависимых реакций гранулоцитов на синтетические красители (кармуазин, сансет желтый, тартразин) использовали реакцию антигениндуцированного повреждения лейкоцитов (РАПЛ) и реакцию выброса миелопероксидазы гранулоцитами (РВМ).

Для постановки РАПЛ 5-10 мл крови брали из вены в пробирку с гепарином (20 ед. на 1 мл крови) и отстаивали в узких пробирках до момента четкого отделения эритроцитов от плазмы. Плазму с лейкоцитами отсасывали, центрифугировали при 1000 об/мин 5 мин. К осадку лейкоцитов добавляли 10 мл раствора, лизирующего эритроциты (0,84% раствор хлористого аммония при 37°C). Ресуспензировали и снова центрифугировали. Полученную лейкосуспензию отмывали два раза стерильным раствором Хенкса. Затем суспензию лейкоцитов разводили этим раствором до 2 млн/мл клеток. В микропробирки или лунки иммунологического планшета, а также контрольные ряды добавляли по 0,05 мл приготовленной лейкоцитарной взвеси и по 0,05 мл 0,01% раствора красителя, приготовленного на забуференном физиологическом растворе хлорида натрия, и инкубировали при 37°C 30 мин. В контрольные пробы краситель не добавляли. Указанная концентрация красителей не повреждала несенсибилизированные лейкоциты. Все пробы дублировали. Центрифугировали при 1000 об/мин 5 минут. В лунки добавляли по 0,05 мл раствора трипановой синьки и подсчитывали процент окрашенных (поврежденных) гранулоцитов в лунках с красителем и в контрольных пробах. Реакция считалась положительной, если более 15% гранулоцитов по сравнению с контрольными пробами окрашивались трипановой синькой [9].

Для постановки РВМ [11] также получали суспензию лейкоцитов крови аналогичным способом. Затем в круглодонные лунки иммунологических планшет вносили 0,1 мл (100 мкл) аналогично разведенного 0,001% раствора красителя и добавляли равный объем лейкосуспензии. Данная концентрация красителей не вызывала выделения миелопероксидазы из несенсибилизированных лейкоцитов. Пробы дублировали. Параллельно ставили

контрольные пробы лейкосуспензии каждого больного со стерильным забуференным физиологическим раствором (отрицательный контроль). Смесь инкубировали 45 мин при 37°C, затем центрифугировали в течение 10 минут при 1500 оборотов в минуту. Осторожно (чтобы не забрать клетки) отсасывали 50 мкл надосадочной жидкости из каждой лунки круглодонной планшеты и переносили в лунку плоскодонной планшеты для ИФА. Вносили проявляющий раствор во все лунки планшеты для ИФА: к надосадочной жидкости добавляли по 150 мкл хромоген-субстратной смеси (0,015% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и тетраметилбензидин). Проявляющий раствор готовился непосредственно перед внесением. Инкубация проводилась при комнатной температуре в течение 15-25 мин до появления выраженного окрашивания синего цвета. Остановка реакции осуществлялась добавлением 50 мкл 4% серной кислоты – цвет раствора изменялся на желтый. Оценку реакции проводили на фотометре при длине волны 450 нм. Результат считался положительным, если оптическая плотность опытной пробы превышала оптическую плотность пробы отрицательного контроля не менее чем в два раза и плотность опытной пробы была не меньше 0,600. При превышении оптической плотности опытной пробы по сравнению с пробой отрицательного контроля менее чем в 2 раза результат считался отрицательным.

Статистическая обработка данных проводилась с помощью программ MS Excel, Statsoft Statistica 7.

### Результаты и обсуждение

Положительная РАПЛ на разные красители наблюдалась в 7-11% случаев у больных

с аллергическими заболеваниями (табл.1). Сходные результаты получены в РВМ, кроме красителя солнечный желтый, на который положительная РВМ была в 4,8% случаев ( $p < 0,08$ ). Всего у больных аллергией выявлено 27% положительных РАПЛ и 20% положительных РВМ, на разные красители, достоверных различий в частоте этих реакций не было.

Более того, между результатами определения повышенной чувствительности лейкоцитов к пищевым красителям по методике РАПЛ и РВМ существовали корреляционные взаимосвязи: так, коэффициент ранговой корреляции Спирмана к кармуазину был  $r = 0,587382$ , к солнечному желтому  $r = 0,413704$ , к тартразину  $r = 0,689698$  (при  $p < 0,05$ ).

Повышенная чувствительность лейкоцитов обследуемых к красному красителю кармуазину наблюдалась у 11 из 114 пациентов по данным РАПЛ и у 9 из 83 по данным РВМ ( $p > 0,05$ ). Непереносимость окрашенных продуктов (напитки, консервы) отмечали соответственно 5 из 11 и 4 из 9 обследованных. Кроме того, один из этих пациентов отмечал непереносимость витаминов, оболочка которых была окрашена в красный цвет. Положительные результаты тестов к желтым красителям – тартразину и солнечному желтому по данным РАПЛ были у 7 и 9 пациентов из 114 соответственно и у 7 и 4 из 83 по данным РВМ.

Между опытной (пациенты с бронхиальной астмой и атопическим дерматитом) и контрольной группой (без аллергических заболеваний и не принимающих лекарственных препараты) имелись достоверные различия в частоте положительных РАПЛ и РВМ (таблица 2 и 3).

Варианты аллергических реакций на пищевые добавки так же разнообразны, как и

Таблица 1

#### Частота реакций гранулоцитов на пищевые красители у больных аллергическими заболеваниями по данным реакций РАПЛ и РВМ

Краситель	РАПЛ n=114	РВМ n=83	Критерий Фишера
Кармуазин	11 (9,6%)	9 (10,8%)	P=0,482
Солнечный желтый	9 (7,89%)	4 (4,8%)	P=0,289
Тартразин	7 (6,1%)	7 (8,4%)	P=0,364
Все красители	27 (23,7%)	20 (24,1%)	P=0,538

Таблица 2

**Различия частоты сенсibilизации гранулоцитов между опытной (пациенты с БА, АД, ХРК) и контрольной группами по данным РАПЛ**

Краситель	РАПЛ n=114	РАПЛ n = 25 контроль	Манна-Уитни U-тест
Кармуазин	11 (9,6%)	1	p = 0,011033*
Солнечный желтый	9 (7,89%)	0	p = 0,008914*
Тартразин	7 (6,1%)	0	p = 0,012683*
Все красители	27 (23,7 %)	1 (4%)	p = 0,0001*

Примечание: \* – достоверные различия.

Таблица 3

**Различия частоты реакций гранулоцитов между опытной (пациенты с БА, АД, ХРК) и контрольной группами по данным РВМ**

Краситель	РВМ n= 83	РВМ n=25 контроль	Манна-Уитни U-тест, p
Кармуазин	9 (10,8%)	1 (4%)	p = 0,014523*
Солнечный желтый	4 (4,8%)	1 (4%)	p = 0,01094*
Тартразин	7 (8,4%)	0	p = 0,012686*
Все красители	20 (24,1%)	2 (8%)	p = 0,003570*

Примечание: \* – достоверные различия.

их химическое строение: возможно развитие типичных немедленных и замедленных аллергических реакций. Низкомолекулярные пищевые добавки, такие, как красители, являясь гаптенами, после соединения с белками, полисахаридами, липидами и другими макромолекулами-носителями, могут превращаться в высокоиммуногенные комплексы, к которым могут синтезироваться антитела. К наиболее распространенным методам, позволяющим выявлять пищевую аллергию, относится иммуноферментный анализ с определением IgE и IgG антител в крови [8]. Мы нашли у 20,5% детей с аллергическими заболеваниями IgE антитела к тартразину, а у 16,2% – к индигокармину [12]. Однако антитела могут связываться с Fc-рецепторами лейкоцитов и других любых клеток организма и не выявляться в крови в свободном виде. Поэтому необходимы клеточные тесты диагностики. Для диагностики аллергии к алиментарным аллергенам иногда рекомендуют клеточный тест (Cellular Allergen Stimulation Test – CAST), основанный на увеличении продукции сульфидолейкотринов, сенсibilизированными базофилами крови под влиянием аллергена [10]. Обнаружено увеличение продукции сульфидолейкотриена (sLT)

лейкоцитами крови у большинства лиц с атопическим дерматитом с доказанной (по методике двойного слепого плацебо контролируемого исследования) чувствительностью к пищевым добавкам и отсутствие увеличения уровня sLT у доноров [10]. Однако необходимо отметить высокую стоимость и трудозатратность этого метода, а также необходимость специально оборудованной лаборатории.

### Заключение

Таким образом, доказано, что у 4-11% больных с аллергическими заболеваниями (бронхиальной астмой, атопическим дерматитом) гранулоциты сенсibilизированы к различным пищевым красителям. Эту сенсibilизацию можно определять в РАПЛ и РВМ. Такая сенсibilизация отсутствует или встречается достоверно реже в контрольной группе.

Достоинствами способа диагностики аллергии к пищевым красителям у больных с аллергическими заболеваниями *in vitro* в реакции выброса миелопероксидазы гранулоцитами и реакции антигениндуцированного повреждения лейкоцитов являются следующие: выявление антител, связанных клетками, что

дает более точную диагностику в острый период заболевания и/или период контакта с аллергеном, простота метода, экономия трудозатрат и времени проведения реакции, возможность скрининговых исследований, достаточно высокая чувствительность и достоверность диагностики аллергии. Практическое применение предлагаемых методов позволит повысить точность диагностики аллергии к пищевым добавкам, учитывая их разнообразный механизм действия и широкое присутствие как в продуктах питания, одежде, косметике, так и в лекарственных препаратах.

### Литература

1. Болотов, В. М. Пищевые красители: классификация, свойства, анализ, применение / В. М. Болотов, А. П. Нечаев, Л. А. Сарафанова. – СПб.: ГИОРД, 2008. – 240 с.
2. Булдаков, А. С. Пищевые добавки / А. С. Булдаков. – М.: ДеЛи-принт, 2003. – 436 с.
3. Гигиенические требования к качеству и безопасности пищевых добавок и их применению // Санитарные правила и нормы 13-10 РБ 2002. – Минск: Минздрав РБ, 2003. – 20 с.
4. Титова, Н. Д. Аллергия на пищу и добавки / Н. Д. Титова // Неотложная терапия и профилактика аллергических заболеваний: сб науч. тр. – Витебск: ВГМУ, 2008. – С. 108-156.
5. Wüthrich, B. Adverse reactions to food additives / B. Wüthrich // *Pediatr Pulmonol.* – 1994. – Vol. 18, N 4. – P. 218-227.
6. Wilson, B. G. Adverse reactions to food additives / B. G. Wilson, S. L. Bahna // *Ann. Allergy Asthma Immunol.* – 2005 – Vol. 95, N 6. – P. 499-507.
7. Metcalfe, D. D. Food allergy: adverse reactions to foods and food additives / D. D. Metcalfe, H. A. Sampson, R. A. Simon. – Blackwell Pub, 2008. – P. 310-370.
8. Новиков, П. Д. Выявление IgE- и IgG-антител к пищевому красителю тартразину в сыворотке крови больных / П. Д. Новиков, Н. Д. Новикова // *Имунопатология, аллергология, инфектология.* – 2006. – № 1. – С. 36-41.
9. Новиков, Д. К. Оценка иммунного статуса / Д. К. Новиков, В. И. Новикова. – М., 1996. – 242 с.
10. Increased leukotriene production by food additives in patients with atopic dermatitis and proven food intolerance / M. Worm [et al.] // *Clin. Exp. Allergy.* – 2001 – Vol. 31, N 2. – P. 265-273.
11. Новиков, П. Д. Диагностика аллергии в реакции выброса миелопероксидазы под влиянием аллергена / П. Д. Новиков, Н. Д. Новикова // *Имунопатология, аллергология, инфектология.* – 2002. – № 1. – С. 63-68.
12. Титова, Н. Д. Антитела к синтетическим пищевым красителям у детей с аллергическими заболеваниями / Н. Д. Титова // *Мед. новости.* – 2010. – № 5-6. – С. 89-92.

*Поступила 28.09.2010 г.  
Принята в печать 06.12.2010 г.*