

## ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

УДК 577.355

## ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОЛОГИИ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ БИОСЕНСОРОВ В ИММУНОЛОГИИ НА ПРИМЕРЕ ИНТЕРПРЕТАЦИИ ТИТРОВ СПЕЦИФИЧЕСКИХ IGG ЧЕЛОВЕКА

М.Ю. Розенштейн<sup>2,4</sup>, Е.С. Ихалайнен<sup>2,3</sup>, С.Э. Кондаков<sup>1,2</sup>, О.С. Прокопцева<sup>2,3</sup>, А.З. Розенштейн<sup>4</sup>

<sup>1</sup>кафедра химической кинетики химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова; <sup>2</sup>НОЦ «Химическая физика биохимических и биологических процессов»; <sup>3</sup>ООО «Иммуновет», Москва, <sup>4</sup>ImmunoHealth Int., USA)

Рассматривается возможность применения методологии неспецифических биосенсоров при интерпретации титров специфических иммуноглобулинов класса IgG для корректного определения границы норма – патология. Предложена математическая модель распознавания образа фазового состояния биологического объекта на основе ранжированного ряда концентраций специфических иммуноглобулинов класса IgG.

**Ключевые слова:** иммунохимия, пищевая химия, биосенсорная методология, диагностика пищевой аллергии и непереносимости.

Иммуноферментный анализ – инструментальный диагностический метод, широко используемый в настоящее время для определения концентрации различных веществ [1]. В медицине данный метод в основном применяется для качественного и количественного определения специфических белков (антител), образующихся при иммунном ответе на тот или иной антиген [2, 3].

Одни из наиболее важных классов антител – иммуноглобулины класса IgG, составляющие около 75–80% от всех иммуноглобулинов сыворотки и 10–20% общего белка сыворотки, играют основополагающую роль в обеспечении длительного гуморального иммунитета (период полураспада составляет около 23–25 сут), например при инфекционных заболеваниях. Считается, что основной функцией иммуноглобулинов IgG является образование комплекса «антиген-антитело». Они способствуют нейтрализации бактериальных экзотоксинов, фагоцитозу, фиксации комплемента, а также могут участвовать в аллергических реакциях. Антитела этого класса появляются через некоторое время после контакта с антигеном и считаются основными антителами вторичного иммунного ответа на большинство антигенов у человека и животных. Дефицит IgG ослабляет сопротивляемость организма к инфекциям [3, 4]. В [таблице](#) приведены

референсные значения нормы концентрации IgG для разных возрастных категорий.

Таким образом, изменение концентрации внутреннего метаболита (иммуноглобулина IgG) в границах условной нормы с точки зрения современной медицины не является свидетельством возникновения патологического процесса. Однако имеются данные, показывающие связь быстрого изменения концентрации IgG в пределах нормы с резким изменением физиологического состояния человека [5].

Цель нашей работы – создание математической модели для более корректного определения границы норма–патология на основе предложенной ранее методологии неспецифических биосенсоров, позволяющей рассматривать биологический объект как динамическую систему и как следствие разрабатывать границы нормы с учетом индивидуального состояния

Возрастные значения норм концентраций IgG

Возраст	IgG, г/л
<1 года	3,5–11,1
1–10 лет	7,3–13,5
>10 лет	8,0–18,0

организма. В настоящее время имеются многочисленные данные о появлении специфических антител IgG на тот или иной продукт питания у человека или животного. В этом случае наличие иммунного ответа чаще всего связано с наличием у человека пищевой аллергии или непереносимости [6]. В случае появления и возрастания концентрации специфического к конкретному продукту IgE благодаря корреляции с клинической картиной диагностируется немедленная пищевая аллергия (пищевая аллергия I типа). Для специфических IgG такой прямой корреляции до настоящего времени не обнаружено, поэтому считается, что повышенная концентрация специфических IgG говорит о развитии скрытой пищевой аллергии или замедленной аллергии (пищевая аллергия III типа) [7].

Проанализируем состояние данного вопроса с точки зрения теории биосенсирования, когда в качестве неспецифического биосенсора рассматривается изменение какого-либо параметра организма в ответ на изменение стимула, воздействующего на организм.

В настоящее время методы диагностики пищевой аллергии основаны на корреляции между концентрацией  $C_n$  специфических иммуноглобулинов класса IgE (для явной) и IgG (для скрытой) в сыворотке крови и иммунной реакцией организма на пищевой антиген. Величина  $C_n$  ( $1 \leq n \leq N$ ), измеряемая «*in vitro*» на основе ИФА\* для  $n$ -го пищевого антигена  $P_n$  из  $N$  тестируемых, отождествляется с амплитудой  $n$ -го «иммунного отклика» системы на проникновение в кровотоки макромолекул исследуемого продукта ( $P_n$ ) [8, 9].

Традиционный подход к решению проблемы определения критерия норма–патология основан на модели обработки данных, используемой в ИФА для диагностики аллергических реакций немедленного типа (Т-I) на основе определения изменения концентрации специфических IgE. В рамках данной модели шкала титров, определяемая выбранными значениями калибраторов, делится на четыре равных диапазона по степени возрастания титров, а амплитуды титров IgG, по аналогу с результатами титров IgE, полученных ИФА, располагают в пределах соответствующих диапазонов. Величина амплитуды единичных «иммунных откликов» общепринято считается главным критерием определения границы раздела между продук-

тами питания, вызывающими и не вызывающими аллергическую реакцию (иммунный ответ) [10].

В отличие от иммуноглобулинов класса IgE, сосредоточенных в тканевых структурах и имеющих постоянный и известный диапазон концентраций, иммуноглобулины IgG локализуются в крови и имеют постоянно меняющийся «фоновый» уровень концентраций, существенно различный как для разных организмов, так и для разных состояний одного организма [11]. Вследствие этого селекция откликов по амплитудам на основе произвольно введенных цифровых или зональных критериев явно недостаточна для корректной диагностики скрытой пищевой аллергии по «иммунному ответу» даже в рамках одного теста и принципиально не позволяет сравнивать экспериментальные данные различных тестов, но предложена для использования в диагностике [12].

С физической точки зрения иммунологический тест на IgG представляет собой совокупность результатов  $N$  независимых ИФА, каждый из которых отражает результат взаимодействия  $n$ -го пищевого антигена со специфическими антителами IgG, содержащимися в исследуемом образце сыворотки крови, при неизменных для данного теста параметрах эксперимента.

Следовательно, результаты тестирования можно представить в виде значений дискретной функции  $C_n = f(P_1, P_2 \dots P_n \dots P_N)$ , где  $C_n$  – измеряемая величина концентрации,  $P_n$  – пищевые антигены, изменяющие свою физическую природу при изменении индекса  $n$ . В данной постановке эксперимента набор экспериментальных данных  $\{C_1, C_2 \dots C_N\}$  не может быть интерпретирован как совокупность независимых стохастических изменений характерного физического параметра, отражающего состояние объекта, в данном случае исследуемого образца крови. Это принципиальное положение, отражающее суть физической модели эксперимента, как правило, не учитывается при статистической обработке данных ИФА по концентрациям IgG. С математической точки зрения каждый суммарный результат  $i$ -го теста является выборкой  $\{C_1, C_2 \dots C_N\}_i$  объемом  $N$  из генеральной совокупности  $N_g$ , представленной в виде дискретного ряда, варианты которого  $C_{ni}$  ( $1 \leq n \leq N$ ) – величины концентраций  $(IgG)_{ni}$ , экспери-

\*ИФА – иммуноферментный анализ.

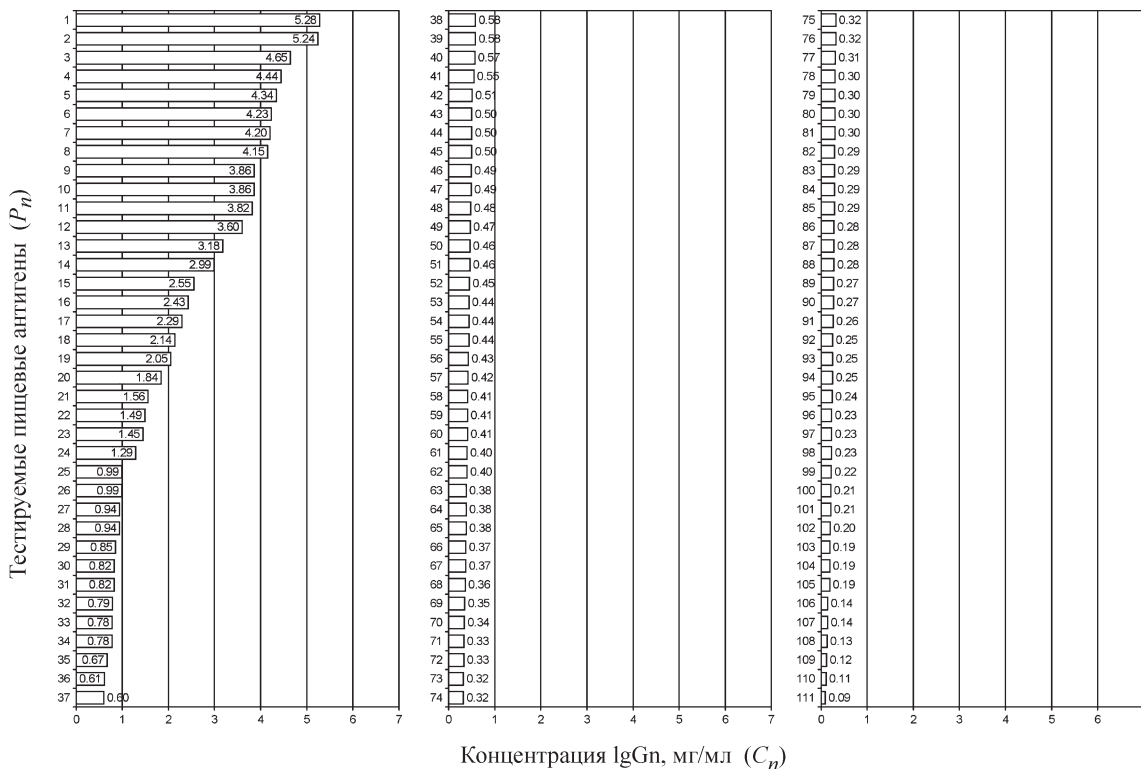


Рис 1. Графическое изображение дискретного ранжированного ряда «иммунных откликов» ( $N = 111$ )

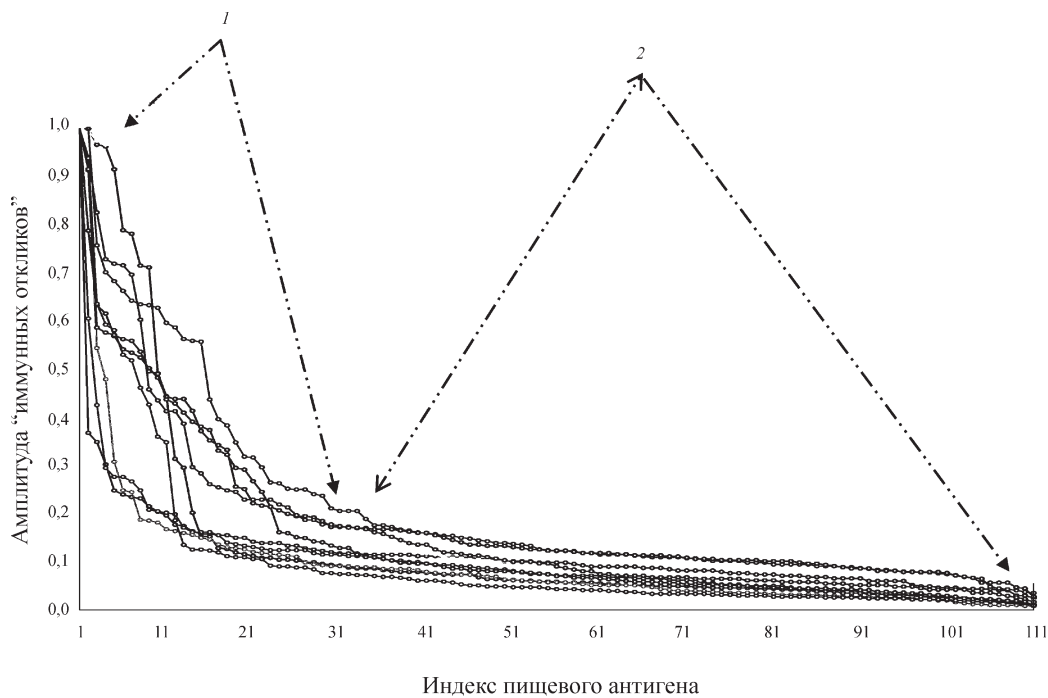


Рис. 2. Вид огибающих «иммунных ответов» для различных ИФА на  $IgG$ : 1 – область нелинейных «иммунных откликов», 2 – область монотонных «иммунных откликов»

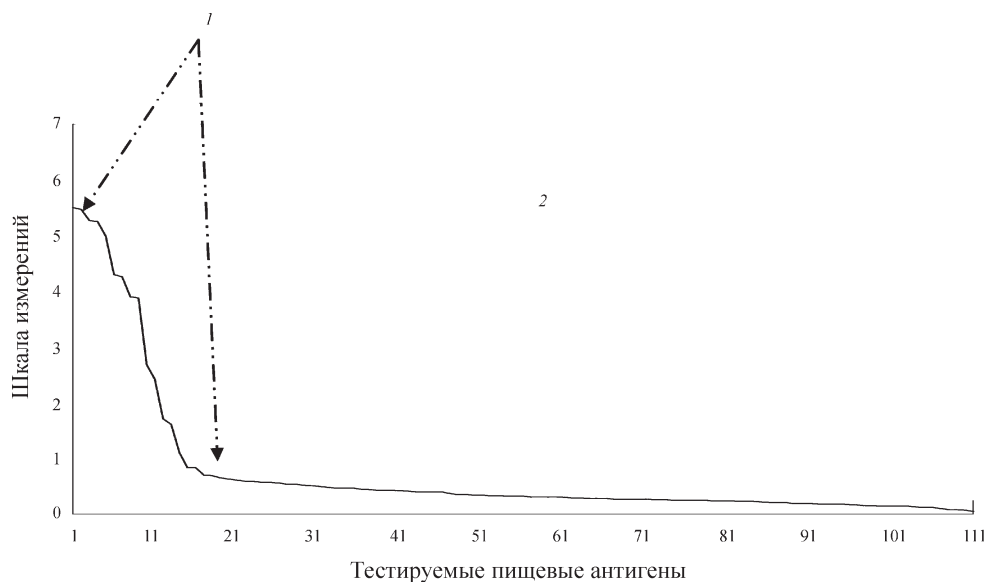


Рис. 3. Графический образ единичного  $i$ -го «иммунного ответа»: 1 – область нелинейных «иммунных откликов», 2 – область монотонных «иммунных откликов» ( $N = 111$ )

ментально получаемые в  $i$ -м тесте для каждого  $n$ -го пищевого антигена. Ранжирование выборки  $N$  или упорядочение вариантов  $\{C_1, C_2 \dots C_N\}_i$  по величине приводит к представлению полученных данных ИФА в виде «иммунного ответа» исследуемого образца крови на  $N$  пищевых антигенов. Графическое изображение типичного «иммунного ответа» в виде дискретного вариационного ранжированного ряда с вариантами  $C_n$ , определяющими «иммунные отклики» образца крови на  $n$ -й пищевой антиген, представлено на рис. 1. Полученный графический образ дискретного вариационного ранжированного ряда может быть интерпретирован как специфичный «иммунный ответ» конкретного организма на статистическую выборку тестируемых пищевых антигенов объемом  $N$ , полученную из генеральной совокупности  $N_g$  по определенным селективным критериям, главным из которых является статистически достоверный набор продуктов, наиболее часто употребляемых в рационе исследуемой популяции.

Поскольку для определения скрытой пищевой аллергии методом ИФА независимо определяется концентрация специфических IgG на большое количество отдельных пищевых антигенов, то корректное использование методов математической статистики требует априорной информации о виде функции плотности распределения вероятности регистрируемых

«иммунных откликов» [13, 14]. Поскольку биохимическая роль разных классов иммуноглобулинов [15] различна, можно предположить, что иммунологический тест на специфические пищевые IgG, формально аналогичный подобному тесту на IgE, должен существенно отличаться от последнего как подходом к обработке данных, так и логикой выводов по результатам тестирования.

Статистический анализ результатов определения концентрации специфических IgG методом ИФА, представленных в виде «иммунных ответов» или графических образов дискретных вариационных ранжированных рядов и соответствующих распределений частот вариантов «иммунных откликов», проведенный по данным тестирования более 10 000 человек в Европе и США на тест-системах разных производителей, совпадающих по антигенам, позволил выявить следующие общие статистические закономерности.

Огибающие «иммунных ответов», представленных в виде графических образов дискретных вариационных ранжированных рядов, показаны на рис. 2. Они состоят из двух характерных участков: нелинейной части (1) и участка монотонных откликов (2). При этом нелинейная область (1) имеет характерный специфический и неповторимый вид для каждого ИФА на IgG. Подобная структура огибающих «иммунных ответов» наблюдается при любых «фоновых» концен-

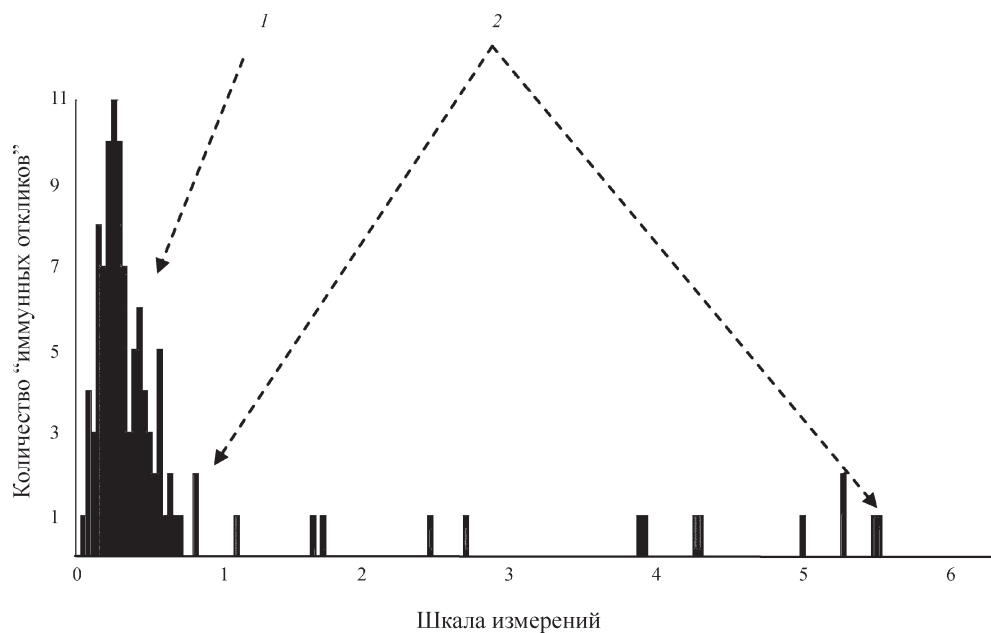


Рис. 4. Спектр частот вариантов  $N$  «иммунных откликов» для единичного ИФА: 1 – сплошная часть спектра, 2 – дискретная область частот вариантов ( $N = 111$ )

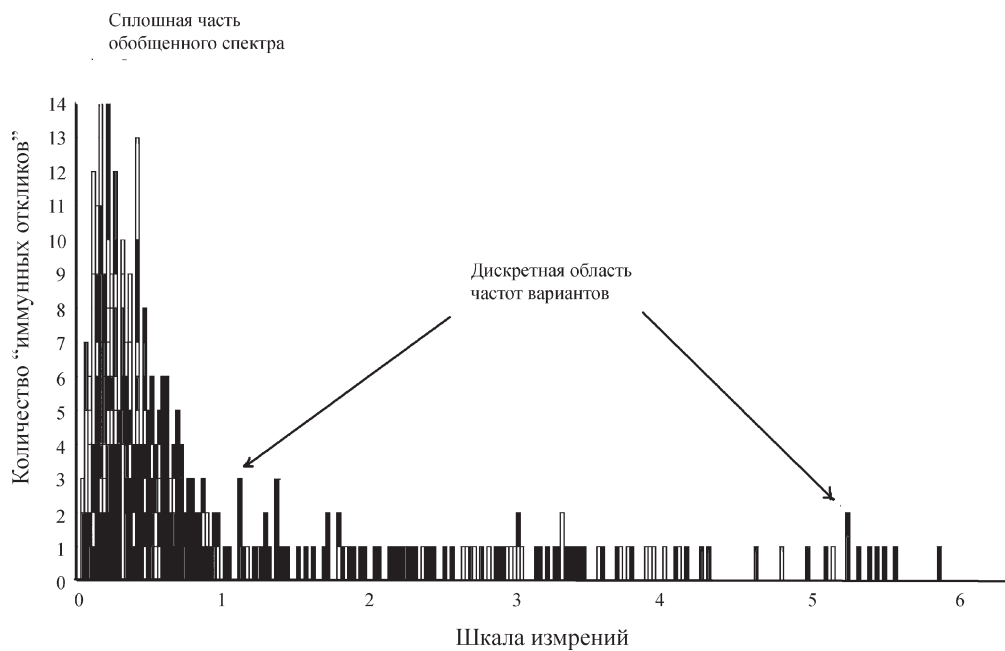


Рис. 5. Вид «обобщенного» спектра частот вариантов  $M$  «иммунных ответов» для 10 различных ИФА на IgG ( $M = 10$ ,  $N = 111$ ).

трациях IgG, не зависит от набора пищевых антигенов и имеет общий характер для всех ИФА на IgG [16, 17].

Характерный графический образ  $i$ -го «иммунного ответа» и соответствующий спектр частот вариантов представлены на рис. 3, 4. Область нелинейных «иммунных откликов» на рис. 3 адекватно отражает дискретную область спектра частот вариантов рис. 4. Подобное соответствие имеет место для всех без исключения пар «иммунный ответ» – спектр частот вариантов «иммунных откликов», наблюдаемых на практике.

Вид «обобщенного» спектра частот вариантов «иммунных откликов» по представительной выборке характерных «иммунных ответов» показан на рис. 5. Сплошная часть подобного «обобщенного» спектра частот вариантов «иммунных откликов» достаточно хорошо описывается логарифмически-нормальной зависимостью при любом представительном наборе числа вариантов. Дискретная часть подобного спектра представляет собой также обобщенную совокупность единичных частот вариантов, соответствующих области нелинейных «иммунных откликов».

На основании проведенных статистических исследований нами предложен диагностический критерий норма–патология, где граница раздела «иммунного ответа», определяющая продукты-антагонисты, производится не по абсолютным значениям амплитуд «иммунных откликов», а по началу перехода квазилинейного участка огибающей «иммунного ответа» к аномальному участку с существенной нелинейностью огибающей. На спектрах частот вариантов «иммунных откликов» эта область совпадает с областью перехода от сплошной части спектра к дискретной.

При подобном подходе абсолютные значения амплитуд откликов, как и наличие меняющегося «фоновая уровня», не играют никакой роли в интерпретации результатов тестирования. Рассматриваются только вид огибающих ранжированного вариационного дискретного ряда и соответствующий спектр частот вариантов «иммунных откликов». Графические образы «иммунных ответов», как и характер соответствующих спектров частот вариантов «иммунных откликов» различны, неповторимы и строго индивидуальны для каждого пациента, что позволяет рассматривать их в качестве достоверного инструмента как идентификации продуктов-антагонистов, так и степени реактивности иммунной системы пациента.

Полученный критерий был использован для диагностики пищевой аллергии III типа у нескольких тысяч пациентов в США и ЕС. Он показал хорошие клинические результаты для устранения различных системных заболеваний, ассоциируемых клинически с пищевой непереносимостью [18]. При этом использование традиционного линейного критерия для диагностики пищевой аллергии не давало клинического эффекта [19].

Таким образом, предлагаемый подход к обработке и интерпретации данных распознавания образа фазового состояния биологического объекта на основе ранжированного ряда концентраций специфических иммуноглобулинов класса IgG может служить основой для более корректной диагностики у пациентов с различными симптомами пищевой аллергии, чем используемый до настоящего времени метод с жестко установленной границей нормы, не учитывающий индивидуальные особенности конкретного организма.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Franek M., Hruska K. Antibody based methods for environmental and food analysis: a review // Vet. Med. (Czech). 2005. **50**. P. 1.
2. Hruska K. Research on paratuberculosis: Analysis of publications 1994–2004. // Veterinarni Medicina. 2004. **49**. P. 271.
3. Roitt I. Essential Immunology. Wiley-Blackwell, 2006.
4. Marinkovich V. Specific IgG antibodies as markers of adverse reactions to foods. Monogr. Allergy. 1996. **32**. P. 221.
5. Neerven R.J., Knol E.F., Eijraes A., Wurzen P.A. // Int. Arch. Allergy. Immunol. 2006. **141**. P. 119.
6. Atkinson W., Sheldon T.A., Shaat N., Whorwell P.J. // Gut. 2004. **10**. P. 1459.
7. Eysink P.E.D., de Jonge M.H., Bindels P.J.E. // Clin. Exp. Allergy. 1999. **29**. P. 604.
8. Воейков В.Л. // Усп. физиол. наук. 1998. **29**. № 4. С. 55.
9. Воейков В.Л., Кондаков С.Э., Розенталь В.М. и др. Пат. РФ № 2152616 С1.
10. Bindslev-Jensen C., Ballmer-Weber B.K., Bengtsson U., Blanco C., Ebner C., Hourihane J., et al. // Allergy. 2004. **59**. P. 690.
11. Calkhoven P.G., Aalbers M., Koshte V.L., Schilte P.P., Yntema J.L., Grioen R.W. et al. // Clin. Exp. Allergy. 1991. **21**. P. 99.
12. Воробьева Н.Л., Агафонов В.Е., Волков А.В. Пат. РФ № 2185178 С1.

13. Stanton A. Glantz Ph.D. Primer of Biostatistics. McGraw-Hill, 1990.
14. Бендат Дж., Пирсол А. Прикладной анализ случайных данных. М., 1989.
15. Brostoff J., Challacombe S.J. Food Allergy and Intolerance. Saunders, 2002.
16. Прокопцева О.С., Кондаков С.Э., Розенштейн М.А. // Тез. конф. «Ломоносов 2009», МГУ, ([http://lomonosov-msu.ru/archive/Lomonosov\\_2009/28\\_6.pdf](http://lomonosov-msu.ru/archive/Lomonosov_2009/28_6.pdf))
17. Розенштейн М.А., Прокопцева О.С., Кондаков С.Э. // Тез. конф. Интермедиаты химических реакций и биологических процессов. М., 2009. С. 39
18. Rozenshteyn A., Rozenshteyn M., Volkov A. Method of Analysis, Detection and Correction of Food Intolerance in Humans // WO 2009/035529 A1; US Patent Appl. 20100227340.
19. Stapel S.O., Asero R., Ballmer-Weber B.K., Knol E.F., Strobel S., Vieths S., Kleine-Tebbe J. Testing for IgG4 against foods is not recommended as a diagnostic tool: EAACI Task Force Report // Allergy 2008 DOI: 10.1111/j.1398-9995.2008.01705.x

Поступила в редакцию 20.01.10

## APPLICATION OF NONSPECIFIC BIOSENSORS METHODOLOGY FOR RIGHT CHOICE OF DIAGNOSTIC CRITERIA FOR FOOD ALLERGY AND INTOLERANCE ON THE BASIS SPECIFIC HUMAN IGG DETERMINATION

**M.Yu. Rozenshteyn, E.S. Ihalainen, S.E. Kondakov, O.S. Prokopzeva, A.Z. Rozenshteyn**  
(Division of Kinetics Chemistry)

**Under consideration is the application of methodology of non-specific biomarkers to the interpretation of the titres of specific immunoglobulins of type IgG for the purpose of accurate determination of a threshold between normal and abnormal values. Proposed is a mathematical model of assessment of a phase status of a biological entity based on the ranking of a series of concentrations of specific immunoglobulins of type IgG.**

**Key words:** *immunochemistry, biosensors methodology, food biochemistry, food intolerance diagnostics.*

**Сведения об авторах:** *Розенштейн Марина Юзефовна* – врач-консультант клиники “ImmunoHealth Int.” (США), соискатель НОЦ «Химическая физика биохимических и биологических процессов» МГУ–РАН; *Ихалайнен Екатерина Сергеевна* – инженер-биохимик ООО “Иммуновет”, соискатель НОЦ «Химическая физика биохимических и биологических процессов» МГУ–РАН; *Кондаков Сергей Эмильевич* – ст. науч. сотр. кафедры химической кинетики химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. фарм. наук; *Прокопцева Ольга Сергеевна* – глав. специалист ООО “Иммуновет”, докторант НОЦ “Химическая физика биохимических и биологических процессов” МГУ–РАН, канд. биол. наук; *Розенштейн Аркадий Зильманович* – глав. специалист клиники “ImmunoHealth Int.” (США), докт. физ.-матем. наук.