

УДК 612.017.3 : 615

Г. Ф. Куракин, И. Н. Живова, Н. М. Аксёненко, Н. А. Адамова, К. С. Максимова, О. В. Волкова

**РАЗРАБОТКА ИММУНОХИМИЧЕСКОГО МЕТОДА ПРОГНОЗИРОВАНИЯ
АЛЛЕРГИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ НА ЛЕКАРСТВЕННЫЙ ПРЕПАРАТ. ПРОБЛЕМЫ
РЕАЛИЗАЦИИ ПРОЕКТА**

**ФГБОУ ВО Тверской государственной медицинский университет Минздрава
России**

Анафилактический шок – одна из самых грозных аллергических реакций [4]. Внезапное её развитие предопределяет высокую летальность.

Помимо этого, анафилактический шок зачастую развивается на лекарственные препараты [4], что может послужить причиной внезапного ухудшения состояния и смерти пациента при лечебной или диагностической процедуре. В связи с этим целесообразным был бы скрининг пациентов на возможность развития анафилактического шока на лекарственный препарат в лечебных учреждениях. Такой скрининг должен быть быстрым, лёгким в проведении и низким по себестоимости.

К сожалению, на сегодняшний день отсутствуют какие-либо возможности для такого скрининга. Это связано с тем, что многие тесты либо неспецифичны, либо дороги и трудоёмки.

Ситуация осложняется тем, что многие лекарственные препараты вызывают не аллергическую, а псевдоаллергическую реакцию, которая проявляется анафилактоидным шоком, клинически неотличимым от анафилактического. Их причиной также зачастую являются лекарственные препараты, причём широко распространённые в анестезиологии [2, 4] и лучевой диагностике [4].

Действие таких веществ основано на неспецифическом, не опосредованном антителами, высвобождении гистамина из тучных клеток и базофилов крови [2, 4]. В связи с этим пробы, основанные на выявлении аллергенспецифических антител, для скрининга на возможность развития такого состояния не подходят [4].

Но, как уже было сказано, общим конечным путём для обоих видов реакций является дегрануляция тучных клеток и базофилов. В связи с этим скрининг может быть основан на реакции дегрануляции базофилов с оценкой выброса гистамина. Такой метод существует и называется тестом на высвобождение гистамина (histamine release test, HRT) [3, 5]. Однако он является трудоёмким и неприменим в клинической практике, используется он, как правило, только для научных целей [3, 5]. Однако, в настоящее время в науке допускается возможность его модификации, которая сделает его применимым в клинике [3].

Цель настоящего исследования – модифицировать HRT, упростить и удешевить его, сделав пригодным для скрининга.

Кроме этого, первоначально предполагалось определить для теста отрезные точки (cut-off), чувствительность, специфичность, положительное и отрицательное прогностические значения. Эти показатели являются основными характеристиками любого медицинского теста [1].

Материалы и методы

Вместо используемых в HRT серийных разведений аллергена и двух контролей использовалась одна доза аллергена и один отрицательный контроль. В качестве аллергена использовался непосредственно испытуемый препарат, в качестве отрицательного контроля – физиологический раствор, в отличие от используемого в HRT буфера [https://www.ibl-international.com/media/catalog/product/R/E/RE95000_IFU_en_Histamine_Release_V2011-08_sym2.pdf]. Время инкубации вместо используемого в HRT 1 часа [https://www.ibl-international.com/media/catalog/product/R/E/RE95000_IFU_en_Histamine_Release_V2011-

08_sym2.pdf] было укорочено до 15 – 20 мин., так как, по предварительным расчётам, этого времени достаточно для высвобождения гистамина из базофилов крови.

Для оценки результатов реакции использовался метод иммуноферментного анализа (ИФА). Для ИФА использовался микропланшетный фотометр модели ImmunoChem-2100 и наборы для иммуноферментного определения гистамина в сыворотке человеческой крови (Histamine ELISA) производства фирмы Labor Diagnostika Nord (LDN).

В качестве экспериментальных организмов использовались кролики.

Было проведено две серии опытов. В первой из них в качестве аллергена использовался 0,5 % раствор прокаина (новокаина), во второй – сыворотка лошадиная против яда гадюки обыкновенной. Анализ крови по разработанной упрощённой методике НРТ выполнялся 3 раза с интервалом в 1-2 недели.

В каждой серии экспериментов использовалось 5 кроликов.

По результатам анализа рассчитывались два показателя, характеризующие высвобождение гистамина: коэффициент высвобождения и абсолютная величина высвобождения. Расчёт данных показателей производился по формулам (1) и (2) соответственно.

$$K_B = N_{\text{оп}} / N_{\text{контр}} \quad (1)$$

где K_B – коэффициент высвобождения, $N_{\text{оп}}$ – содержание гистамина в опытной пробирке, $N_{\text{контр}}$ – содержание гистамина в отрицательном контроле;

$$R_a = N_{\text{оп}} - N_{\text{контр}} \quad (2)$$

где R_a – абсолютная величина высвобождения, $N_{\text{оп}}$ – содержание гистамина в опытной пробирке, $N_{\text{контр}}$ – содержание гистамина в отрицательном контроле.

После забора крови проводилась биопроба (введение раствора аллергена кроликам). В последний день когда проводился анализ крови кроликов на высвобождение гистамина, вводилась разрешающая доза. Для новокаина он равнялась сенсibiliзирующей (1 мл), а для сыворотки против яда гадюки – 2 мл при сенсibiliзирующей дозе 0,5 мл.

В дни, когда не проводился эксперимент с высвобождением гистамина, проводилась сенсibiliзация кроликов: новокаином – в течение 14 дней, сывороткой против яда гадюки – в течение 2 дней после первой инъекции.

Результаты

Только один опыт (второй опыт первой серии) согласовывался с нашими ожиданиями: коэффициенты высвобождения в нём все были больше единицы, а абсолютные величины высвобождения – больше нуля. В остальных опытах в 45 % случаев коэффициент высвобождения был менее единицы, а абсолютная величина высвобождения была отрицательной. Обратная ситуация имела место в 55 % случаев.

В каждом опыте, кроме второго опыта первой серии, соотношение случаев с отрицательной и положительной абсолютной величиной высвобождения и, соответственно, с коэффициентом высвобождения меньше и больше единицы составляло 2 : 3 – 3 : 2. Учитывая малый разбор выборки, можно считать, что во всех опытах, соотношение случаев с отрицательной и положительной абсолютной величиной высвобождения и, соответственно, с коэффициентом высвобождения меньше и больше единицы составляло приблизительно 1 : 1, что можно считать свидетельством того, что в данных опытах получены случайные числа, что указывает на значительную случайную ошибку эксперимента.

Дополнительные данные дала статистическая обработка полученных значений коэффициента высвобождения для каждого опыта.

Во всех опытах среднее арифметическое коэффициента высвобождения лежало в диапазоне 0,89 – 1,202, а среднеквадратичное отклонение во всех опытах, кроме первого опыта первой серии, находилось в диапазоне 0,14 – 0,23. В первом опыте первой серии среднее арифметическое коэффициента высвобождения было максимальным (1,202), а среднеквадратичное отклонение гораздо больше, чем в остальных опытах (0,727), что свидетельствует о большем разбросе результатов первого опыта первой серии. Это может

быть связано с тем, что в первом опыте была допущена ошибка эксперимента, заключающаяся в двухкратной заморозке/разморозке образца, что может сильно влиять на результат ИФА.

Но такой ошибки не было допущено в остальных опытах, с чем, вероятно, связаны более низкие значения среднеквадратичного отклонения коэффициента высвобождения. Результаты второго опыта первой серии, судя по статистическим показателям, не исключительны среди результатов остальных опытов. Среднее арифметическое коэффициента высвобождения в данном опыте равнялось 1,18, а среднеквадратичное отклонение равнялось 0,15, что вполне укладывается в общую картину результатов. Таким образом, наличие только значений коэффициента высвобождения, больших единицы (и, следовательно, только положительных значений абсолютной величины высвобождения) в данном опыте, скорее всего, случайно.

Средние значения коэффициентов высвобождения в каждом из перечисленных опытов колеблются около единицы.

Для последнего опыта (с разрешающей дозой) второй серии вычисления ещё не закончены. Однако, определены коэффициенты высвобождения. В 4 образцах из 5 они находятся в диапазоне 0,68 – 1,35 (среднее арифметическое 4-х результатов 1,07), что согласуется с предыдущими результатами. Из этой общей тенденции выбивается последний образец (№ 5), где коэффициент высвобождения составил 3,01.

Результаты биопробы были отрицательными (аллергическая реакция не развивалась) во всех опытах, кроме последнего опыта второй серии, где наблюдались аллергические реакции, самопроизвольно купировавшиеся (реакция слабopоложительная). Среди этих реакций наблюдались судорожные, диспноэтические (вероятно, бронхоспастического генеза) с цианозом, абдоминальные (непроизвольная дефекация). Судя по ухудшению общего состояния кроликов, присутствовала также гипотония.

Обсуждение и выводы

Несмотря на проводимую сенсibilизацию и введение разрешающей дозы, ни у одного из кроликов не возникла развёрнутая картина анафилактического шока. Наблюдались только слабopоложительные аллергические реакции. Корреляция между данными реакциями и результатом реакции высвобождения гистамина не была получена.

Можно предположить, что окончательные выводы будут возможны только после наблюдения развёрнутой картины анафилактического шока.

Благодарности

Авторы благодарят Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере за финансовую поддержку проекта по программе «УМНИК».

Список использованной литературы

- 1) Гарднер Д., Шобек Д. Базисная и клиническая эндокринология. Книга 1/ Пер. с англ. – М.: Издательство БИНОМ, 2013. – 464 стр.
- 2) Катцунг, Бертрам Г. Базисная и клиническая фармакология: В 2 т. Том 1 / Пер. с англ. – 2-е издание, перераб. и доп. – М.; СПб.: Издательство Бином – Издательство «Диалект», 2007. – 648 с., ил.
- 3) Паттерсон Р., Грэммер Л. К., Гринбергер П. А. Аллергические болезни: диагностика и лечение: Пер. с англ./Под ред. акад. РАМН А. Г. Чучалина (гл. ред.), чл.-кор. РАМН И. С. Гущина (отв. ред), Э. Г. Улумбекова (отв. ред.), Р.С. Фассахова (отв. ред.) – М.: ГЭОТАР МЕДИЦИНА, 2000. – 768 с.
- 4) Чепель Э., Хейни М., Мисбах С., Сновден Н. Основы клинической иммунологии/ Перевод с англ. – 5-е изд. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 416 с.: ил.
- 5) Histamine-Release - IBL International [Электронный ресурс] – Режим доступа. – URL: https://www.ibl-international.com/media/catalog/product/R/E/RE95000_IFU_en_Histamine_Release_V2011-08_sym2.pdf. – Дата обращения: 3.12.2016 г.