УДК 615.2/.3.015.5/.8.07
Б. Оробчук, В. Дем'яненко

ДЕЯКІ МЕТОДИЧНІ АСПЕКТИ АВТОМАТИЗОВАНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ІНДИВІДУАЛЬНОЇ МЕДИКАМЕНТОЗНОЇ НЕПЕРЕНОСНОСТІ

Розглядаються методичні аспекти способу лабораторного визначення індивідуальної чутливості організму до медикаментозних засобів на основі ефекту модуляції ними резистентності мембран клітин крові, зокрема еритроцитів у реакції кислотного гемолізу. Пропонуються технічні вирішення, спрямовані на підвищення точності та оперативності аналізу шляхом оптимізації умов взаємодії інгредієнтів у реакції та автоматизації гемолітичного процесу і аналізу результатів.

Використання ізольованих клітинних систем як біологічного тест-об'єкта в імунодіагностичних реакціях для визначення індивідуальної медикаментозної непереносності (ІМН), зокрема суспензії лейкоцитів або розведеної нативної крові грунтується на еволюційно детермінованій здатності ізольованих живих клітин репрезентувати організм як ціле в реакціях на пошкодження чинників довкілля [1,5]. Принцип екстраполяції цитонекробіотичних процесів, що відбуваються на рівні ізольованої клітини, на весь організм як багатоклітинну високоорганізовану біосистему виступає при цьому методологічною основою пошукових досліджень з метою розробки перспективних висо- коінформативних методів діагностики ІМН [2,4,6].

У методичному аспекті безперечну перевагу віддають кількісним методам визначення ІМН, насамперед, виходячи з сучасних вимог до точності аналізу, відтворюваності, а отже достовірності результатів клініколабораторного дослідження в цілому [2,3,5]. З цих позицій проблема вибору конкретної методики кількісного аналізу рівня індивідуальної медикаментозної чутливості залишається актуальною.

Кількісні методики імунодіагностичних реакцій з використанням лейкоцитів традиційно грунтуються на термістометричних та кондуктометричних дослідженнях, які дозволяють автоматизувати реєстрацію деструктивних процесів в ізольованих клітинах під впливом алергену, в даному випадку - медикаментозного засобу (МЗ) [3,4,6].

Більш точним і інформативним слід визнати метод діагностики ІМН, оснований на здатності водорозчинних МЗ змінювати резистентність мембран еритроцитів до дії стандартного гемолітичного чинника, наприклад, соляної кислоти в реакціях кислотного гемолізу (РКГ) [4]. При цьому загальною особливістю методичного підходу є одночасне використання неспецифічного і специфічного компонентів пошкодження клітин крові в діагностичній цитопатичній реакції: специфічний компонент цитодеструктивного процесу визнача-

ється імунноконфліктною взаємодією молекул МЗ з детермінантними групами макромолекулярних структур мембран клітин крові і виступає в ролі специфічного модулятора резистентності мембран до пошкоджуючого впливу неспецифічного - стандартного чинника, наприклад, гіпоосмолярності позаклітинного середовища або соляної кислоти. Різниця між характером контрольного і дослідного гемолізу (з попередньою інкубацією суміші клітин із медикаментом) коректно відображує модулюючу дію алергену на ізольовану клітину, прогнозуючи у такий спосіб ймовірну реакцію гіперчутливості всього організму на парентерально введений МЗ.

Методика визначення ІМН на основі РКГ [4] має суттєвий недолік: надто високе розведення нативної крові (1:100) в ізотонічному розчині хлориду натрію. Висока ступінь розведення крові в інкубаційній суміші зумовлює недостатній рівень точності аналізу, бо хоч і забезпечує необхідне для проведення лабораторної проби гальмування процесу тромбування нативної крові, проте, значно підвищує здатність до електролітичної дисоціації як відносно простих молекул, так і білкових та білково-ліпідних макромолекулярних комплексів, що нівелює специфічний характер взаємодії алергенів із детермінантними групами мембран сенсибілізованих клітин. До недоліків відомого способу також слід віднести громіздкість розрахунків показників медикаментозної чутливості на основі результатів вимірювань, що обмежує впровадження методики в широку медичну практику. Усе це й визначило задачу даної роботи, а саме: підвищення точності і оперативності методики визначення індивідуальної медикаментозної непереносності на основі медикаментозної модуляції РКГ.

Виходячи з неможливості використання гемостабілізуючих чинників (цит- рат або оксалат натрію, гепарин та ін.), які, запобігаючи згортанню крові, захищають поверхню мембран ізольованих клітин крові від пошкоджуючого впливу алергенів, у тому числі медикаментозного походження, з відповідним зниженням точності лабораторного дослідження, проведено вивчення залежності рівня пошкоджуючого впливу на мембрани еритроцитів медикаментозних засобів від ступеня розведення нативної крові.

Проведене дослідження показало, що розведення нативної крові ізотонічним розчином хлориду натрію (0.85%) вже у співвідношенні 1:5 запобігає згортанню її у скляному посуді. Про вплив на точність лабораторного тесту різних розведень нативної крові можна зробити висновок з аналізу результатів дослідження, наведених в табл. 1.

Таблиця 1

Залежність тривалості контрольної і модульованої реакцій кислотного гемолізу від ступеня попереднього розведення нативної крові (X ± s)

Розведення нативної крові	Тривалість реакції кислотного гемолізу, с			
	Контроль	Стрептоміцин	Вітамін В6	Новокаїн
1 : 5	360+10	360+10	360+10	360+10
1 : 10	360+10	360+10	360+10	360+10
1 : 20	370+20	370+20	370+20	370+20
1 : 40	380+20	380+20	380+20	380+20
1 : 80	370+30	370+30	370+30	370+30

Аналіз наведених результатів вказує на доцільність використання розведення нативної крові в ізотонічному розчині хлориду натрію 1:10 як таке, що гарантує уникнення згортання досліджуваної крові при збереженні

високого рівня точності лабораторного дослідження. Так, коливання тривалості реакції кислотного гемолізу в контролі практично не залежить від ступеня попереднього розведення крові. Найбільші відхилення від контролю мали місце в реакції ізольованої крові на стрептоміцин і новокаїн, а саме: стрептоміцин прискорював гемоліз при розведенні крові 1:5 на 19.4% ($p<0.05$), а при розведенні 1:10 відповідно на 16.7% у порівнянні з контролем ($p<0.05$).

При розведеннях крові 1:40 і 1:80 відмінності між контрольними і дослідними реакціями не досягали рівня 3% ($p>0.05$). Аналогічна закономірність спостерігається при інкубації ізольованої крові з новокаїном: найбільші відмінності від контролю відзначені при розведенні крові 1:5 (прискорення гемолізу на 13.9%; $p<0.05$) та 1:10 (відповідно на 16.7%; $p<0.05$) при незначних відхиленнях результату при більш високих розведеннях.

Таким чином, при проведенні визначення індивідуальної медикаментозної чутливості виготовляли робочу суміш еритроцитів у розведенні 1:10 шляхом змішування 0.5 мл нативної крові з 4.5 мл ізотонічного розчину хлориду натрію.

Конкретно визначення індивідуальної медикаментозної чутливості проводили таким чином. Готували робочу суміш еритроцитів у розведенні 1:10 шляхом змішування 0.5 мл нативної крові з 4.5 мл ізотонічного розчину хлориду натрію.

Для визначення контрольного рівня реакції кислотного гемолізу у вимірювальну кювету фотоеритрогемометра вносили 0.2 мл робочої суміші еритроцитів і змішували з 1.8 мл ізотонічного розчину хлориду натрію. Кювету вставляли в вимірювальну комірку фотоеритрогемометра, вносили стандартний гемолітик - 2.0 мл 2×10^{-3} М HCl на ізотонічному розчині хлориду натрію і визначали РКГ за зниженням екстинкції інкубаційної суміші.

У досліді до 0.2 мл робочої суміші клітин у мікропробірку додавали 0.02 мл водного розчину дослідного медикаментозного засобу, в певній концентрації, обережно струшували і інкубували при 24° С протягом 10 хвилин, після чого вміст мікропробірки переносили до вимірювальної кювети, додавали 1.8 мл ізотонічного розчину хлориду натрію і 2 мл розчину соляної кислоти, після чого реєстрували дослідну РКГ.

З метою підвищення оперативності лабораторного дослідження здійснена автоматизація таких важливих етапів, як реєстрація гемолітичного процесу в кюветі, обчислення результатів та їх клініко-лабораторний аналіз. Для цього сигнал із фотоелектричного перетворювача фотоеритрогемометра подавали на вхід операційного підсилювача, де цей сигнал приводиться до стандартного виду, необхідного для подальшого перетворення аналого-цифровим перетворювачем у цифровий код і подачі в персональний комп'ютер (ПЕОМ) із заданим кроком дискретизації. У ПЕОМ формується масив даних, який аналізується і проходить обробку за заданим алгоритмом.

Похідні криві гемолітичної реакції - контрольна і дослідна - аналізуються за двома її головними параметрами: значенням максимальної інтенсивності реакції у мілівольтах, тобто амплітуди, та часом її досягнення в секундах із визначенням індексу модульованого гемолізу (Imh) за формулою:

$$Im\,h = \frac{ak \cdot tk}{am \cdot tm},$$

де ak і am - значення амплітуд контрольної і дослідної реакцій, tk і tm - відповідно, час досягнення пікових значень цих реакцій.

Отже, алгоритм автоматизованої оцінки індивідуальної чутливості до медикаментів полягає в графічній побудові модульованого молекулами МЗ

гемолітичного процесу у вигляді кривої та наступному порівнянні її з контрольною кривою у того ж пацієнта, з еталонною кривою, яка відображує середньостатистичний гемолітичний процес у здорових людей (контроль) та середньостатистичними стандартними кривими, визначеними для різних груп медикаментів, реєстр яких занесено в банк даних ПЕОМ.

На основі співставлення даних лабораторного дослідження 34 осіб з алергією до різних МЗ з характером клінічних проявів у вигляді симптомів медикаментозної непереносності розроблені критерії оцінки статусу ІМН за величиною індексу Imh із виділенням двох типів медикаментозної непереносності (Таблиця 2), які вимагають відповідної корекції медикаментозного лікування .

Таблиця 2

Критерії оцінки індивідуальної медикаментозної чутливості на основі модульованої реакції кислотного гемолізу

Значення Imh	Категорії ІМН-статусу
0.900 і вище	Резистентність еритроцитів і рівень індивідуальної чутливості до МЗ в межах умовної норми
0.725 - 0.899	Понижена резистентність еритроцитів - підвищений рівень чутливості до МЗ: медикаментозна непереносність 1 типу
0.724 і нижче	Низька резистентність еритроцитів - низький рівень чутливості до МЗ: медикаментозна непереносність 2 типу

Принципово сутність медичних рекомендацій на основі визначення індивідуальної чутливості до МЗ полягає в тому, що при медикаментозній непе- реносності 1 типу застосування відповідних ліків можливе під прикриттям гіпосенсибілізуючих засобів, тоді як при ІМН 2 типу їх використання у даного пацієнта є недоцільним як таке, що пов'язане з високим ступенем ризику для здоров'я і життя.

Таким чином, зниження рівня розведення нативної крові в імуногематологічних діагностичних реакціях, зокрема в МЗ-модульованій РКГ, суттєво підвищує рівень точності лабораторного дослідження, а автоматизація реєстра- ції і оцінки статусу ІМН на основі МЗ-модульованої РКГ з використанням ПЕОМ за висотою технічного рішення, рівнем точності і клініко-лабораторної інформативності відповідає сучасним вимогам лабораторного аналізу і сприятиме впровадженню даного методичного підходу в широку медичну практику.

Summary. Some methodic aspects of the laboratory method of the determination of hypersensibility of an organism to the drug on the base of the effect of drug modulation resistance of erythrocytes membranes in the acid haemolitic test are discussed. The technical solutions for preciseness increasing of and the technology of the laboratory research by means of the interaction conditions of components optimization in the test reaction and hemolytic process listing the automatization and the analysis results are proposed.

Література:

1. Гурин Н.Г., Чижевская В.С.,Концевая Н.С. Реакция лейколизиса в диагностике аллергии к антибактериальным препаратам в пульмонологии.-Антибиотики.- 1978.- № 12.- С.1102-1108.
2. Демьяненко В.В., Курочкин В.И.Цитолюминесцентная модуляция электрических колебаний звуковой частоты как метод регистраии биоэнергетических сдвигов в живой и переживающей клетке.// Пат.физиол. и эксперим.терапия.- 1979.- № 4.- С.71-72.

3. Демьяненко С.М. Количественная оценка клеточно-гуморальной реакции крови больных туберкулезом на специфический аллерген.//Пробл. туб.-1979.- № 8. - С.60-62.
4. Демьяненко С.М. Автоматизированная оценка индивидуальной лекарственной чувствительности.// Лаб.дело.-1988.- № 3.-С.41-43.
5. Китаев М.И., Засухина И.Б. О механизме повреждаемости нейтрофилов в аутоаллергических реакциях при туберкулезе.// Сов.мед.-1974.- №2. -С.18-23.
6. Колпакова Т.А., Старикин Ю.А. Диагностика лекарственной аллергии методом иммунотермистографии в лечении туберкулеза. //Пробл. туб.-1979.- № 8. - С.58-60.