

В.Н.Минеев, И.И.Нестерович, Г.Б.Федосеев, Е.А.Шпетная

## ДИАГНОСТИКА ЛЕКАРСТВЕННОЙ НЕПЕРЕНОСИМОСТИ НА ЭРИТРОЦИТАРНОЙ МОДЕЛИ

Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им.акад.И.П.Павлова

DIAGNOSIS OF DRUG INTOLERANCE ON AN ERYTHROCYTIC MODEL

V.N.Mineyev, I.I.Nesterovich, G.B.Fedoseyev, E.A.Shpetnaya

### Summary

This study intended to elaborate an erythrocytic model approach to diagnosis of drug sensibilisation through an evaluation of lipid peroxidation and the electrophoretic mobility of erythrocytes.

The contact of erythrocytes with causal drugs resulted in a major increase of dien conjugate levels and an increased percentage of erythrocytes with a high electrophoretic mobility.

The erythrocytic model revealed effects of the causal drug even in patients taking glucocorticoids.

### Резюме

Целью исследования явилась разработка подхода к диагностике лекарственной непереносимости с помощью эритроцитарной модели на основе оценки перекисного окисления липидов и электрофоретической подвижности эритроцитов.

Было показано, что контакт с причинно-значимым лекарственным агентом приводил в эритроцитах к существенному нарастанию уровня диеновых конъюгатов, а также к нарастанию процента содержания эритроцитов с большой электрофоретической подвижностью.

Эффект влияния причинно-значимого лекарственного агента выявлен с помощью эритроцитарной модели даже у больных, получающих глюкокортикоидные препараты.

Для клинициста проблема диагностики лекарственной непереносимости в силу нарастания аллергических заболеваний и использования высокоактивных лекарственных препаратов представляет особый интерес.

Справедливо полагают, что лекарственная непереносимость — это не только медицинская, но и социальная проблема [15].

Наша заинтересованность в данной проблеме связана с возможностью исследования изменений мембрано-рецепторного комплекса в условиях моделирования процессов, происходящих при взаимодействии эритроцитарной мембраны и лекарства, вызывающего у больного непереносимость. Несомненным достоинством эритроцитарной модели для изучения мембрано-рецепторных нарушений при бронхиальной астме (БА) является ее относительная однородность, отсутствие в эритроцитах так называемых внутренних мембран, а также доступность для клинического анализа. Кроме этого получает развитие представление об активной иммунорегуляторной роли эритроцитов [6].

Несмотря на большое количество информационного материала по диагностике лекарственной непереносимости, нет ни одного метода, как *in vivo*, так и *in vitro*, который позволил бы клиницисту с большой достоверностью и соответственно без всякой опасности для здоровья и жизни больного поставить этиоло-

гический диагноз лекарственной непереносимости [11]. Тщательно, умело собранный анамнез по-прежнему имеет решающее значение и во многих случаях позволяет своевременно предсказать возможность лекарственной непереносимости.

По Л.Йегеру (1990) различают следующие виды нежелательных действий лекарственных препаратов [5]: интоксикация, побочное действие, парадоксальный эффект (например, возбуждение при назначении барбитуратов), вторичное действие (например, реакция Яриша-Герксгеймера, микозы или дисбактериоз при антибиотикотерапии), реакции, возникающие при неправильном введении лекарств, псевдоаллергические, аллергические. Считается [5], что в принципе любое лекарственное средство может вызвать аллергическую сенсibilизацию, однако к настоящему времени становится все более актуальным значение так называемых псевдоаллергических реакций на лекарства, при которых, в отличие от истинно аллергических, не участвуют иммунологические механизмы.

Псевдоаллергические реакции имеют две стадии развития: патохимическую и патофизиологическую [11], причем особая роль в развитии этих реакций отводится таким медиаторам, как гистамин, лейкотриены, продукты активации комплемента, калликреин-кининовой системы.

Пожалуй, основная трудность, осложняющая разработку способов лекарственной непереносимости, в понятие которой нами включены как аллергические, так и псевдоаллергические реакции, связана с тем, что один и тот же препарат может вызывать не только различные патологические синдромы, но и любой тип гиперчувствительности, хотя считается [15], что реакции немедленного типа встречаются с наибольшей частотой.

Поэтому перед нами встала задача разработать такой способ диагностики лекарственной непереносимости, который позволил бы выявить и оценить те процессы, которые составляют центральный коммуникационный этап при взаимодействии клетки и ксенобиотика. В качестве такого биохимического этапа мы выбрали перекисное окисление липидов (ПОЛ), ибо активация этого процесса рассматривается как неспецифическая ответная реакция на любой стресс в процессе адаптации клетки при воздействии внешних факторов, включая реакцию на ксенобиотики [13].

Будет рассмотрен еще один аспект исследования мембрано-рецепторного комплекса эритроцитов при моделировании процессов, связанных с лекарственной непереносимостью, — исследование электрофизиологических особенностей эритроцитарной мембраны.

Мы проводили исследования лекарственной непереносимости с помощью двух методов: с помощью оценки динамики диеновых конъюгатов в эритроцитах и с помощью определения электрофоретической подвижности (ЭФП) эритроцитов в присутствии различных лекарственных препаратов.

В контрольную группу лиц, у которых не было получено анамнестических данных о наличии лекарственной непереносимости, вошли практически здоровые лица (4 человека) и 7 больных БА с различными клинко-патогенетическими вариантами.

Группу больных, у которых были выявлены анамнестические данные о наличии лекарственной непереносимости при исследовании динамики диеновых конъюгатов, составили 7 больных БА с различными клинко-патогенетическими вариантами, включая 3 больных с непереносимостью нестероидных противовоспалительных препаратов. В группу больных с лекарственной непереносимостью, получающих глюкокортикоидные препараты, включено 4 больных БА.

Исследования проводили с лейкоцезвесью и эритроцезвесью одновременно, исследовали влияние преимущественно пенициллина, эритромицина и анальгина. Учитывая однотипность реакции на воздействие различных препаратов в соответствующих группах обследованных лиц, результаты исследования объединены.

В группу обследованных лиц с лекарственной непереносимостью, не принимавших и принимающих глюкокортикоидные препараты при исследовании ЭФП эритроцитов, вошли больные БА с различными клинко-патогенетическими вариантами заболевания (11 и 5 больных соответственно указанным группам).

Эритромаасса, полученная из венозной крови, трижды отмывалась и в количестве 1 мл инкубировалась с лекарствами (5 тыс. ЕД пенициллина, эритромицина, 0,1 мл 1% раствора анальгина), в контрольную пробирку

вносили 0,1 мл изотонического раствора хлорида натрия. Опытную и контрольные пробирки инкубировали в термостате при 37°C в течение 20 мин. После этого, используя 0,2 мл субстрата, проводили исследование содержания диеновых конъюгатов по известному методу В.А.Костюка, А.И.Потаповича и Е.Ф.Лунец (1984). Исследования проводили совместно с А.К.Бадиной.

При определении лекарственной непереносимости к пенициллину с помощью определения ЭФП эритроцитов по 0,05 мл капиллярной крови помещали в пробирки (№ 1 — контрольная, № 2 — с 5 тыс. ЕД пенициллина), содержащие по 1,0 мл забуференного (рН 7,2) физиологического раствора. Обе пробирки инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре (20°C). После инкубации определяли ЭФП эритроцитов с помощью микроэлектрофореза (автоматический измерительный микроскоп Пармоквант-2, Карл Цейсс Йена, Германия). Измеряли ЭФП по 100 эритроцитам в контроле и в присутствии пенициллина, высчитывали процентное содержание эритроцитов с ЭФП, равной  $1,0 \text{ мкм} \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{В}^{-1} \cdot \text{см}$  и более.

Динамика нарастания диеновых конъюгатов насыщенных жирных кислот как показателя начальных этапов ПОЛ в лейкоцезвеси и эритроцезвеси в присутствии различных лекарственных препаратов представлена в табл.1.

В результате исследования обнаружено, что как в лейкоцитах, так и в эритроцитах контакт клеток с причинно-значимым лекарственным агентом приводил к существенному нарастанию диеновых конъюгатов, что свидетельствовало о нарастании ПОЛ, причем это касалось как лекарств, вызывающих обычно аллергические реакции (пенициллин), так и лекарств, приводящих к псевдоаллергическим реакциям (анальгин). Применение эритроцитарной модели позволяет установить лекарственную непереносимость у больных, получающих глюкокортикоидные препараты, что делает эту модель неопределимой у широкого контингента больных.

Результаты исследования ЭФП эритроцитов приведены в табл.2. Оценивалось процентное содержание

Таблица 1

Результаты исследования лекарственной непереносимости с помощью оценки динамики диеновых конъюгатов в лейкоцезвеси и эритроцезвеси ( $M \pm m, \%$ )

	Лекарственная переносимость (1)	Лекарственная непереносимость	
		Гормоны - (2)	Гормоны + (3)
Лейкоцезвесь	9,2±3,1 n=14	51,7±4,8 n=12 p <sub>1-2</sub> <0,001	2,7±3,6 n=8 p <sub>2-3</sub> <0,001
Эритроцезвесь	7,2±2,1 n=14	31,4±3,8 n=12 p <sub>1-2</sub> <0,001	32,3±4,0 n=8 p <sub>2-3</sub> >0,05

Примечание. n — количество исследований с лекарственным препаратом.

Таблица 2

Динамика ЭФП эритроцитов при воздействии пенициллина ( $M \pm m, \%$ )

Группы	Лекарственная переносимость (1)	Лекарственная непереносимость (2)
I. Глюкокортикоиды не получали	$-5,1 \pm 1,5$ $n=10$	$+15,1 \pm 1,0$ $n=11$ $p_{1-2} < 0,001$
II. Глюкокортикоиды получали		$+17,4 \pm 1,3$ $n=5$ $p_{1-II} > 0,05$

эритроцитов с ЭФП, равной  $1,0 \text{ мкм} \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{В}^{-1} \cdot \text{см}$  и более, до и после воздействия пенициллина.

Как видно из табл. 2, при лекарственной непереносимости пенициллина нарастает процентное содержание субпопуляции эритроцитов с большой ЭФП, появлялись даже отдельные эритроциты с ЭФП, равной  $1,30 \text{ мкм} \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{В}^{-1} \cdot \text{см}$ . Подчеркнем, что эффект пенициллина сохранялся и у больных, получающих глюкокортикоиды.

Анализируя преимущества и недостатки разработанных к настоящему времени методов диагностики лекарственной непереносимости *in vitro*, таких, как тест дегрануляции базофилов по Шелли, тест дегрануляции тучных клеток, тест торможения миграции лейкоцитов, бласттрансформации лейкоцитов, тест ППН по Фрадкину и целого ряда других, обращало внимание на то, что большинство исследователей обходит такую, на наш взгляд, существенную проблему, как эффективность диагностики у больных, получающих глюкокортикоиды. Область применения глюкокортикоидов становится, к сожалению, все шире, причем эти препараты нередко применяются в течение длительного времени постоянно, используются и пролонгированные препараты (например, кеналог).

Установлено, что глюкокортикоиды могут проявлять свой биологический эффект на всех трех стадиях аллергической реакции [11], причем этот эффект касается и ПОЛ, и тесно связанного с ним метаболизма арахидоновой кислоты [14].

Сравнительная оценка методов лекарственной непереносимости *in vitro* [2] показала, что, действительно, у больных, получающих глюкокортикоиды, информативность диагностики снижается и при применении оценки прироста диеновых конъюгатов в лейкоцитах, и при оценке адренозависимого гликогенолиза в лимфоцитах. Надо отметить, что все клетки, применяемые для диагностики лекарственной непереносимости, являются ядродержащими и, таким образом, могут быть подвержены влиянию глюкокортикоидов через цитозольные глюкокортикоидные рецепторы. В эритроцитах, как безъядерных клетках, рецепторов в цитозоле не обнаружено [4].

Нельзя не сказать, однако, что в настоящее время предполагается наличие мембранных рецепторов глю-

кокортикоидов [12]. Подобные рецепторы выявлены и на эритроцитах [4]. Так, на тенях эритроцитов человека число специфических связывающих мест для кортизола составило  $2,59 \cdot 10^{13}$  моль/мг белка и  $2,58 \cdot 10^{13}$  моль/мг белка при использовании дексаметазона.

Правда, трудно пока выделить вклад мембранного этапа в реализацию действия гормона, гипотетичен пока и физиологический смысл преобразования гормонального сигнала на уровне мембраны, хотя стоит учитывать данные, тоже пока гипотетические, что глюкокортикоиды, наряду с простагландинами, ионами металлов, входят как основные компоненты в состав "посадочной площадки" адренорецептора [10].

Нельзя, конечно, исключить влияние глюкокортикоидов на мембранный ответ клетки в процессе их неспецифического связывания с мембраной, учитывая хорошую растворимость гормонов в липидах, что одинаково касается как лейкоцитов, так и эритроцитов [4]. Во всяком случае с помощью эритроцитов как безъядерных клеток, лишенных цитозольных глюкокортикоидных рецепторов, можно было бы оценить относительный вклад этих рецепторов в ответ клетки на взаимодействие с причинно-значимым лекарственным агентом.

Как известно, электрический заряд клетки является одной из фундаментальных мембранных характеристик. Выраженность электрического заряда, его динамика интегрально отражают физиологические и патофизиологические процессы, происходящие прежде всего на мембранном уровне [7].

В связи с этим было решено оценить модификацию электрического заряда эритроцитов при контакте их с причинно-значимым лекарственным агентом — пенициллином. Выбор пенициллина был обусловлен широкой распространенностью случаев непереносимости, связанных с этим лекарственным препаратом. Приводится удручающая статистика шоков с летальным исходом в результате применения инъекций пенициллина: в США ежегодно регистрировалось от 300 до 1000 смертельных случаев [15].

Антигенные детерминанты пенициллина могут вызвать не только шоковые реакции, но и аллергический бронхоспазм, отек Квинке, крапивницу. При этом считается, что доминирующими являются реакции немедленного типа [5,15]. Представляло также интерес оценить влияние пенициллина на электрический заряд эритроцитов, учитывая известный факт, что молекулы пенициллина имеют отрицательный электрический заряд [7].

Подытоживая исследования мембрано-рецепторного комплекса эритроцитов с помощью воздействия пенициллином, можно отметить, что эритроцитарные мембраны обнаруживают способность взаимодействовать с пенициллином, обладающим отрицательным зарядом. О механизмах подобного взаимодействия сведений в литературе нет, однако выскажем некоторые предположения.

Во-первых, феномен нарастания субпопуляции эритроцитов с большой ЭФП при воздействии пенициллина обнаружен только в случаях, где имелась лекарственная непереносимость. В группе, где лекарственная

непереносимость не отмечалась, наблюдали тенденцию к уменьшению содержания субпопуляции эритроцитов с высокой ЭФП, что можно объяснить влиянием положительно заряженных молекул натрия, контактирующих с эритроцитарной мембраной, учитывая, что нами применена натриевая соль бензилпенициллина. Избыточная же адсорбция пенициллина на эритроцитах приводит при лекарственной непереносимости к нарастанию содержания данной субпопуляции эритроцитов.

Заманчиво объяснить избыточность адсорбции пенициллина при лекарственной непереносимости тем, что в процессе взаимодействия пенициллина как причинно-значимого агента и мембраны возникает деполяризация мембраны, тесно связанная с включением в регуляцию  $Ca^{2+}$  и активацией  $Ca^{2+}$ -зависимых процессов метаболизма липидов. Вероятность такого хода событий существует, учитывая, что пенициллинсвязывающий компонент имеет липидную природу и входит в состав мембраны [7]. Если предлагаемый ход событий имеет место при взаимодействии пенициллина и эритроцитарной мембраны, то он, вероятно, аналогичен мембранным событиям, протекающим в лимфоцитах при их контакте с различными возмущающими сигналами, такими, в частности, как антитела [9].

### Заключение

Таким образом, показано участие мембраны эритроцитов в реализации ответа клетки при взаимодействии ее с лекарственным агентом, вызывающим непереносимость, которая проявляется, судя по анамнезу, клинически, то есть на уровне органа (бронхоспазм, крапивница, отек Квинке) и организма (шок). В настоящее время пока рано делать определенные выводы о возможном участии эритроцитов в генерализации реакций непереносимости, однако такую возможность следует предположить, учитывая хотя бы данные о том, что эритроциты могут стать источником продуктов липоксигеназного пути метаболизма арахидоновой кислоты, тесно сопряженного с активацией ПОЛ [3], а также решающую роль эритроцитов в зоне микроциркуляции.

Во всяком случае при исследовании лекарственной непереносимости могут быть использованы эритро-

цитарные мембраны как с целью изучения молекулярных механизмов, лежащих в основе непереносимости, так и с прикладной целью диагностики, что было учтено нами при разработке изобретений [1,8].

В заключение подчеркнем преимущество разработанных нами методов диагностики, позволяющих выявить лекарственную непереносимость у больных, получающих глюкокортикоидные препараты.

### ЛИТЕРАТУРА

1. А.с. 1681253 СССР. Способ диагностики лекарственной непереносимости / Бадина А.К., Минеев В.Н. // Открытия.— 1991.— № 36.
2. Бадина А.К. Разработка методов диагностики лекарственной непереносимости *in vitro* с использованием показателей, характеризующих состояние мембрано-рецепторного комплекса лимфоцитов у больных бронхиальной астмой и другими заболеваниями: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук.— Л., 1990.
3. Вершигора А.Е. Общая иммунология.— Киев: Выща школа, 1990.— 736 с.
4. Голиков П.П. Рецепторные механизмы глюкокортикоидного эффекта.— М.: Медицина, 1988.— 288 с.
5. Йегер Л. Клиническая иммунология и аллергология.— М.: Медицина, 1990.— Т.2.— 560 с.
6. Каральник Б.В. Эритроциты, их рецепторы и иммунитет // Успехи соврем. биол.— 1992.— Т. 112, № 1.— С.52—61.
7. Мирошников А.И., Фомченко В.М., Иванов А.Ю. Электрофизический анализ и разделение клеток.— М.: Наука, 1986.— 184 с.
8. Пат. 2023268 РФ Способ определения гиперчувствительности к пенициллину / Минеев В.Н., Жихарев С.С. // Открытия.— 1994.— № 21.
9. Петров Р.В., Атауллаханов Р.И. Клеточные мембраны и иммунитет.— М.: Медицина, 1991.— 144 с.
10. Подымов В.К., Пирузян Л.А., Гладких С.П., Кац М.М., Нижний С.В. Простагландины, стероиды и рецепция (опыт моделирования структуры активных центров адренорецепции) // Изв. АН ССР. Сер. Биол.— 1980.— № 1.— С.27—44.
11. Пыцкий В.И., Адрианова Н.В., Артомасова А.В. Аллергические заболевания.— М.: Медицина, 1990.— 368 с.
12. Сергеев П.В., Шимановский Н.Л. Рецепторы физиологически активных веществ.— М.: Медицина, 1987.— 400 с.
13. Сыромятникова Н.В., Гончарова В.А., Котенко Т.В. Метаболическая активность легких.— Л.: Медицина, 1987.— 168 с.
14. Федосеев Г.Б., Хлопотова Г.П. Бронхиальная астма.— Л.: Медицина, 1988.— 272 с.
15. Фрадкин В.А. Диагностические и лечебные аллергены.— М.: Медицина, 1990.— 256 с.

Поступила 07.04.97.