

Изобретение относится к медицине, в частности к аллергологии, и может быть использовано в лабораторной диагностике непереносимости ацетилсалициловой кислоты у больных бронхиальной астмой.

Известен способ диагностики непереносимости ацетилсалициловой кислоты **In vitro**, заключающийся в определении интенсивности цитотоксического влияния веществ, выделяемых активированными ацетилсалициловой кислотой тромбоцитами на культуру **Sh. Manson**. Способ осуществляют следующим образом: из периферической крови больного путем центрифугирования при 2000об/мин выделяют тромбоциты, помещают их в буфер Тироде, затем инкубируют их с ацетилсалициловой кислотой, после чего снова центрифугируют при 3000об/мин, полученный супернатант добавляют в пробирку с культурой **Sh. Manson**, инкубируют в течение 30мин и подсчитывают количество живых клеток тест-культуры до и после инкубации с супернатантом и по уменьшению количества живых клеток судят о наличии повышенной чувствительности к ацетилсалициловой кислоте у больных бронхиальной астмой.

Однако данному способу присущи следующие недостатки:

применение в качестве тест-объекта культуры патогенного штамма **Sh. Manson** небезопасно для исследователя, т.к. достаточно высока вероятность заражения дизентерией; технологическая сложность осуществления способа (специфическая оснащенность лаборатории для работы с бактериями, выделение чистой культуры тромбоцитов).

В основу изобретения поставлена задача усовершенствования способа диагностики непереносимости ацетилсалициловой кислоты **In vitro** у больных бронхиальной астмой, в котором определяют специфическую активацию тромбоцитов больного в присутствии ацетилсалициловой кислоты в реакции активного розеткообразования, где в качестве тест-культуры используют лимфоциты больного, выявляют угнетение интенсивности **Ea-POK** больных, что позволяет диагностировать непереносимость ацетилсалициловой кислоты у больных более простым и безопасным способом.

Поставленная задача решается тем, что в способе диагностики непереносимости ацетилсалициловой кислоты **In vitro** у больных бронхиальной астмой путем инкубации тромбоцитов больного в присутствии ацетилсалициловой кислоты с тест-культурой, согласно изобретению, в качестве тест-культуры используют лимфоциты, выделенные из периферической крови больного, в реакции активного розеткообразования определяют исходное количество **Ea-POK** и количество **Ea-POK** после инкубации лимфоцитов с супернатантом обогащенной тромбоцитами плазмы в присутствии ацетилсалициловой кислоты и при снижении количества **Ea-POK** в пробе с ацетилсалициловой кислотой на 25% и более по сравнению с исходным - диагностируют непереносимость ацетилсалициловой кислоты.

Способ осуществляют следующим образом. Проводят забор 10мл крови из вены больного утром натощак. Для получения обогащенной тромбоцитами плазмы 5мл крови помещают в силиконизированную или пластиковую пробирку, содержащую 0,5мл 3,8% цитрата натрия. Стабилизированную цитратом кровь центрифугируют 5 - 7мин при 1000об/мин, затем 2мл обогащенной тромбоцитами плазмы помещают в силиконизированную пробирку, добавляют 20мкг аспизола, который является растворимой формой аспирина, и инкубируют в течение 15мин при 37°C, после чего центрифугируют в течение 15мин при 3000об/мин и собирают супернатант.

Для выделения лимфоцитов 5мл крови обследуемого больного помещают в пробирку с 0,1мл гепарина. Выделение лимфоцитов и приготовление взвеси эритроцитов для проведения реакции активного розеткообразования осуществляют по стандартной методике (по **Wilbran I., Fudenberg H., Hungh H. Thymus-derived rozette-forming cells in various human disease states: cancer, lymphoma, bacterial and viral infections and other diseases//J. Clin. Invest. - 1973. - V. 52, № 5, - P. 1026**). Реакцию активного розеткообразования (**Ea-POK**)

проводят в двух вариантах: определение исходного количества **Ea-POK**;

определение **Ea-POK** в присутствии супернатанта обогащенной тромбоцитами плазмы, преинкубированной с аспизолом.

Определение исходного количества **Ea-POK** проводят следующим образом: в пробирку вносят 0,1мл 3% взвеси эритроцитов барана, добавляют 0,1мл лимфоцитарной взвеси (в концентрации 2×10^6 в 1мл), затем перемешивают. Смесь инкубируют 30мин при 37°C, центрифугируют в течение 5мин при 1000об/мин, полученные клетки ресуспендируют, в камере Горяева подсчитывают 200 лимфоцитов и определяют процент розеткообразующих клеток.

Определение **Ea-POK** в присутствии супернатанта обогащенной тромбоцитами плазмы, преинкубированной с аспизолом, проводят следующим образом: 0,1мл взвеси лимфоцитов (в концентрации 2×10^6 в 1мл) инкубируют с 0,1мл супернатанта обогащенной тромбоцитами плазмы в течение 30мин при 37°C, после чего проводят реакцию активного розеткообразования

по общепринятой методике (по **Wibran I., Fudenberg H., Hung H. Thymus-derived rosette-forming cells in various human disease states: cancer, lymphoma, bacterial and viral infections and other diseases//J. Clin. Invest. – 1973. – V. 52, № 5, – P. 1026).**

Реакция считается положительной при снижении количества розеткообразующих клеток в пробе с ацетилсалициловой кислотой на 25% и более относительно исходного уровня.

Опытным путем установлено, что доза аспизола 20мкг явилась наиболее оптимальной для проведения реакции с диагностической целью. Доза аспизола менее 20мкг в недостаточной степени вызывала активацию тромбоцитов больных аспириновой бронхитальной астмой. Доза больше 20мкг оказывал а такое же действие на интенсивность активного розеткообразования. Разведение аспизола готовится следующим образом: 0,5г аспизола разводится в 4,5мл среды 199, в полученном разведении содержится 100мг аспизола в 1мл, из этого разведения 0,5мл + 4,5мл среды 199 - в 1мл - 10мг, из последнего разведения 0,1мл + 0,9мл среды (1мл - 100мкг). Доза 20мкг будет содержаться в 0,2мл.

Приводим конкретные примеры выполнения способа.

Пример 1. Больная У., 38 лет, диагноз: бронхиальная астма инфекционно-аллергическая форма, 1ст., тяжелое течение, гормонозависимая, фаза обострения. Хронический полипозный этмоидит. Непереносимость нестероидных противовоспалительных препаратов. Накануне исследования, для подтверждения непереносимости аспирина, проведена провокационная ингаляционная проба с аспирином *in vivo*, проба положительная. Иммунологическое исследование крови выполнено предлагаемым способом: исходный уровень **Ea-POK** составил 22%, а при постановке реакции с супернатантом обогащенной тромбоцитами плазмы, преинкубированной с аспирином, **Ea-POK** составила 11%, т.е. по сравнению с исходным уровень **Ea-POK** снизился на 50%. Реакция положительная.

Пример 2. Больной К., 42 года, диагноз: бронхиальная астма, атопическая форма, 1ст., тяжелое течение, фаза обострения. Хронический полипозный этмоидит. Непереносимость нестероидных противовоспалительных препаратов. Накануне исследования, для подтверждения непереносимости аспирина, проведена провокационная ингаляционная проба с аспирином. Проба положительная. Иммунологическое исследование крови выполнено предложенным способом: исходный уровень **Ea-POK** составил 29%, а при постановке **Ea-POK** с супернатантом обогащенной тромбоцитами плазмы, преинкубированной с аспирином, **Ea-POK** составили 21%, по сравнению с исходным уровень снизился на 27,6%, реакция положительная.

Пример 3. Больной М., 52 года, диагноз: бронхиальная астма, инфекционно-аллергическая форма, 1ст., течение средней тяжести, фаза обострения. Хронический рецидивирующий полипозный этмоидит. Провокационная ингаляционная проба с аспирином отрицательная. Иммунологическое исследование крови выполнено предлагаемым способом: исходный уровень **Ea-POK** - 28%, в реакции с тромбоцитарной плазмой, преинкубированной с аспирином, уровень **Ea-POK** - 24%. Снижения уровня **Ea-POK** не выявлено. Реакция отрицательная.

Данные по проведенным исследованиям обобщены в табл.1.

Из таблицы видно, что в среднем исходный уровень **Ea-POK** у больных аспириновой бронхиальной астмой (1 группа) и больных другими формами БА, переносящих аспирин, был одинаковым. При использовании в реакции розеткообразования обогащенной тромбоцитами плазмы, преинкубированной с аспирином, уровень **Ea-POK** в 1 группе снизился в среднем на $50,3 \pm 7,6\%$, а во 2 группе на $14,7 \pm 2,9\%$. При этом непереносимость аспирина была подтверждена в 70% случаев больных 1 группы, ложно положительная реакция наблюдалась у 1 больного 2 группы.

Для определения диагностической значимости метода проводили 4 варианта реакции:

- 1 - определение исходного уровня **Ea-POK**;
- 2 - определение **Ea-POK** в присутствии аспизола;
- 3 - определение **Ea-POK** в присутствии обогащенной тромбоцитами плазмы;
- 4 - определение **Ea-POK** в присутствии обогащенной тромбоцитами плазмы, инкубированной с аспирином.

Полученные данные представлены в табл.2.

Для разработки метода диагностики непереносимости ацетилсалициловой кислоты были сформированы 2 группы больных БА: 1 - я 17 больных АЗБА, у которых непереносимость АСК была подтверждена положительной оральной или ингаляционной провокационными пробами, и 2 - я, в количестве 11 человек, которые переносили ацетилсалициловую кислоту.

При анализе полученных данных было установлено, что исходный уровень **Ea-POK** в 1 и 2 группах достоверно не отличался. В присутствии аспизола интенсивность **Ea-POK** проявляла тенденцию к снижению, как в 1 так и во 2 группе, однако это снижение было статистически недостоверным. Добавление обогащенной тромбоцитами плазмы также вызывало угнетение розеткообразования, но и это снижение интенсивности реакции было недостоверным. При

проведении реакции **Еа-РОК** в присутствии обогащенной тромбоцитами плазмы, инкубированной с аспизолом, угнетение активного розеткообразования наступало только у больных АЗБА ($31,0 \pm 3,15\%$ до $14,6 \pm 2,62\%$, $p < 0,01$).

При определении процента снижения **Еа-РОК**, установлено, что в 1 группе он составил $50,3 \pm 7,6\%$, а во второй - $14,7 \pm 2,8\%$. Исходя из этого можно было считать реакцию положительной при снижении интенсивности **Еа-РОК** на 35% и более по сравнению с исходным уровнем **Еа-РОК**, однако, учитывая, что среди аспириновых больных в 3 случаях процент снижения реакции был равен $25,9 \pm 1,2\%$ (что достоверно больше, чем во 2 группе - $14,7 \pm 2,9$), мы сочли возможным считать реакцию положительной при ее падении на 25% и более. Таким образом, предлагаемый способ по сравнению с прототипом является безопасным за счет исключения патогенных микроорганизмов в качестве тест-культуры и замены последней на лимфоциты того же больного, а также методически более простым и легко выполнимым. Предлагаемый способ может быть широко использован в учреждениях практического здравоохранения.

Таблица 1

Динамика розеткообразования в ходе проведения диагностической пробы с аспизолом

Группы	п/п	Еа-РОК исх(%)	Еа-РОК с тромбоцит плазмой (%)	% снижение Еа-РОК
1	1	38	29	23,7
	2	43	6	86,1
	3	22	11	50,0
	4	18	12	33,4
	5	29	21	27,6
	6	25	14	44,0
	7	39	12	69,3
	8	34	25	26,5
	9	37	8	78,4
	10	22	8	63,4
M±m		31,0±3,15	14,6±2,62*	50,3±7,6
2	1	30	30	0
	2	18	24	14,3
	3	38	33	13,2
	4	44	35	20,5
	5	24	18	25,0
M±m		32,8±4,67	28,0±2,84	14,7±2,9

* - $p < 0,01$

Таблица 2

Интенсивность Еа-РОК в различных вариантах реакции

Наименование реакции	АЗБА 1 группа - п- 17	БА 2 группа п - 11
Еа-РОК исходное, %	31,0±3,15	32,8±4,67
Еа-РОК с аспизолом, %	26±3,07	26,3±5,8
Еа-РОК с тромбоцитарной плазмой, %	25,8±4,4	20,0±4,85
Еа-РОК с тромбоцитарной плазмой, инкубированной с аспизолом	14,6±2,62*	28,0±2,84
% снижения реакции	50,3±7,6	14,7±2,9

* - $p < 0,01$