



УКРАЇНА

(19) UA (11) 29803 (13) A

(51) B A61B6/00, A61B6/03

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ІНДИВІДУАЛЬНОЇ МЕДИКАМЕНТОЗНОЇ ЧУТЛИВОСТІ

(21) 97073492

(22) 02.07.1997

(24) 15.11.2000

(33) UA

(46) 15.11.2000, Бюл. № 6, 2000 р.

(72) Оробчук Богдан Ярославович, Дем'яненко Василь Васильович, Дем'яненко Світлана Михайлівна

(73) ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. ІВАНА ПУЛЮЯ

(57) Спосіб визначення індивідуальної медикаментозної чутливості, який включає попередню інкубацію розчину нативної крові з водним розчином медикаментозного засобу й наступною реєстраці-

єю модульованої реакції кислотного гемолізу, який відрізняється тим, що в реакцію беруть робочий розчин крові в розведенні 1:10, а похідні криві гемолітичної реакції - контрольну і дослідну - аналізують за показниками максимальної інтенсивності реакції (в мілівольтах), тобто амплітуди, та часу її досягнення (в секундах) з визначенням індекса модульованого гемолізу (Imh) за формулою:

$$Imh = a_k \cdot t_m : a_m \cdot t_k$$

де a_k і a_m - значення амплітуд контрольної і дослідної реакцій, t_k і t_m - час досягнення пікових значень цих реакцій відповідно.

Винахід відноситься до медицини й може бути використаний в лабораторній практиці, зокрема в діагностиці індивідуальної непереносності ліків та інших хімічних речовин.

Відомий спосіб визначення індивідуальної медикаментозної чутливості організму шляхом постановки лабораторних діагностичних проб *in vitro*, суть яких полягала в здатності тих чи інших медикаментів - алергенів - викликати специфічні пошкодження ізольованих клітин, наприклад, аглютинацію та лізис лейкоцитів периферичної крові, які спостерігали в полі зору світлового чи люмінесцентного мікроскопу і оцінювали якісними методами [1].

Недолік відомого способу полягає в неточності результатів внаслідок якісних методик оцінки пошкоджень клітин, що знижує клініко-діагностичну значимість способу в цілому.

Відомий спосіб визначення індивідуальної медикаментозної чутливості, оснований на автоматизованій реєстрації та кількісній оцінці модулюючого впливу медикаментозного засобу на резистентність мембран еритроцитів периферичної крові в реакції кислотного гемолізу [2].

Принцип модуляції резистентності клітинних мембран полягає в попередній інкубації розчину нативної крові в розведенні 1:100 з тим чи іншим медикаментом на протязі 10 хвилин, після чого визначався час повного гемолізу, ініційованого введенням в вимірювальну кювету з розчином крові стандартного гемолітика - соляної кислоти.

Недоліком відомого способу є недостатня точність результатів вимірювання внаслідок інкубації медикаментозного засобу з надто високим розведенням нативної крові, а саме 1:100. Високе розведення крові в ізотонічному розчині натрію хлориду підвищує здатність до електролітичної дисоціації як відносно простих молекул, так і білкових і білково-ліпідних макромолекулярних комплексів, що нівелює специфічний характер взаємодії алергенів з детермінантними групами мембран сенсibiliзованих клітин. До недоліків відомого способу слід віднести громіздкість розрахунків показників медикаментозної чутливості на основі результатів вимірювань.

Технічне завдання полягало в тому, щоб удосконалити спосіб визначення індивідуальної медикаментозної чутливості, в якому шляхом зменшення розведення нативної крові досягають збільшення інтегральної поверхні взаємодіючих в реакції інгредієнтів, в результаті чого підвищують точність і технологічність способу.

При розгляді технічного завдання була прийнята до уваги фундаментальна властивість нативної крові згортатись при контакті з стінками скляного посуду. Процес тромбоутворення як природна фізіологічна функція системи крові й організму як цілого унеможливорює відокремлення клітин з тромбу для подальшого дослідження, а введення в ізольовану кров стабілізуючих чинників, таких, наприклад, як цитрат або оксалат натрія, гепарин та ін. хоч і запобігає згортанню крові, проте блокує поверхню мембран ізольованих клітин, у даному

випадку еритроцитів, що супроводжується зниженням ймовірності взаємодії детермінантних груп адсорбованих на клітинній поверхні антитіл з алергенами - медикаментозними засобами. Це запобігає пошкодуючому впливу їх на мембрани клітин, а отже знижує точність визначення індивідуальної медикаментозної непереносності.

Разом з тим, розведення нативної крові ізотонічним розчином хлориду натрію (0,85%) вже у співвідношенні 1:5 запобігає згортанню її в скляному посуді. Тому з метою підвищення точності дослідження при умові гарантованого уникнення згортання крові в скляному лабораторному посуді доцільним слід визнати розведення крові ізотонічним розчином крові у співвідношенні 1:10. При такому підході є підстави розраховувати на принаймні десятикратне підвищення точності та технологічності способу.

Результати дослідження залежності рівня пошкоджуючого впливу на мембрани еритроцитів медикаментозних засобів від величини розведення нативної крові наведені в табл. 1.

Таблиця 1

Залежність тривалості контрольної і модульованої реакції кислотного гемолізу від ступені попереднього розведення нативної крові ($X \pm s$, $n=7$)

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

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, як видно з табл. 1, коливання тривалості реакції кислотного гемолізу в контролі практично не залежить від ступеню 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% ($p > 0,05$). Аналогічну закономірність спостерігали при інкубації ізольованої крові з новокаїном: найбільші відмінності від контролю відмічені 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 у випадку застосування більш високих розведень.

Поставлене завдання вирішують тим, що у способі визначення індивідуальної медикаментозної чутливості, який включає попередню інкубацію розчину нативної крові з водним розчином медикаментозного засобу й наступною реєстрацією модульованої реакції кислотного гемолізу, у відповідності до винаходу в реакцію беруть робочий розчин крові в розведенні 1:10, а похідні криві гемолітичної реакції - контрольну і дослідну - аналізують за показниками максимальної інтенсивності реакції (в мілівольтах), тобто амплітуди, та часу її досягнення (в секундах) з визначенням індекса модульованого гемолізу (Imh) за формулою:

$$Imh = a_k \cdot t_m : a_m \cdot t_k,$$

де a_k і a_m - значення амплітуд контрольної і дослідної реакцій, t_k і t_m - час досягнення пікових значень цих реакцій відповідно.

Конкретно спосіб здійснюють таким чином. Готують робочу суміш еритроцитів в розведенні 1:10 шляхом змішування 0,5мл нативної крові з 4,5 мл ізотонічного розчину хлориду натрію.

Для визначення контрольного рівня реакції кислотного гемолізу у вимірвальну кювету фотоеритрогемометра вносять 0,2 мл робочої суміші еритроцитів і змішують з 1,8 мл ізотонічного розчину хлориду натрію, кювету вставляють у вимірвальну комірку фотоеритрогемометра та вносять стандартний гемолітик – 2,0 мл $2 \cdot 10^{-3}$ М НСІ на ізотонічному розчині натрію хлориду - і визначають реакцію кислотного гемолізу по зниженню екстинкції інкубаційної суміші.

В досліді до 0,2 мл робочої суміші клітин у мікропробірці додають 0,02 мл водного розчину дослідного медикаментозного засобу в певній концентрації, обережно струшують і інкубують при 24°C на протязі 10 хвилин, після чого вміст мікропробірки переносять до вимірвальної кювети, додають 1,8 мл ізотонічного розчину натрію хлориду і 2 мл соляної кислоти, після чого реєструють дослідну реакцію гемолізу.

Реєстрацію гемолітичного процесу і обчислення результатів здійснюють автоматично з використанням персонального комп'ютера. Кількість дискретних вимірювань k визначають автоматично в циклічному режимі на основі порівняння значень екстинкції суміжних вимірювань E_k і E_{k+1} . Загальне число вимірювань задають величиною k_{max} , яка не перевищує 14, тобто по два вимірювання через кожні 30 с на протязі 7 хвилин (середня тривалість реакції у здорових осіб). Побудова кривої швидкості гемолізу здійснюють за відомим алгоритмом, який передбачає обчислення величини процентного співвідношення (X_i) зміни екстинкції між двома послідовними вимірюваннями ($E_{k+1} - E_k$) і максимальною амплітудою екстинкції ($E_k - E_1$). По значеннях X_i будують графічну залежність $f = X_i(i)$ та визначають індекс модульованого гемолізу Imh , користуючись наведеною вище формулою.

Приклади застосування способу

Приклад 1. Хвора О., 52 років. Клінічний діагноз: Остеохондроз поперекового відділу хребта. Люмбоішалгія з радикалярним синдромом на рівні L2-L5. Супутній діагноз: гіперчутливість до ліків (медикаментозна непереносність) при парентеральному застосуванні у вигляді кропивниці, шкірного зуду, розладів травлення, загальної слабкості.

Для визначення індивідуальної чутливості до ліків і можливої їх непереносності брали для аналізу такі медикаментозні засоби:

Вітамін В1 (Sol. Thiamini bromidi 3% - 1 ml)

Вітамін В2 (Sol. Riboflavini mononucleotidi 1% - 1 ml)

Вітамін В6 (Sol. Pyridoxini hydrochloridi 1% - 1 ml)

Вітамін С (Sol. Ac. ascorbinici 5% - 1 ml)

Вітамін В 12 (Sol. Cyanocobalamini 0,01% - 1 ml)

Дімедрол (Sol. Dimedroli 1% - 1 ml)

Новокаїн (Sol. Novocaini 0,5% - 2 ml)

Пірабутол (Pyrabutoli - 5 ml)

Готували робочу суміш еритроцитів в розведенні 1:10 шляхом змішування 0,5 мл нативної крові з 4,5 мл ізотонічного розчину хлориду натрія.

Визначали контрольний рівень реакції кислотного гемолізу. Для цього у вимірювальну кювету фотоеритрогемометра вносили 0,2 мл робочої суміші еритроцитів і змішували з 1,8 мл ізотонічного розчину хлориду натрія. Кювету вставляли в вимірювальну комірку фотоеритрогемометра і ініціювали гемоліз введенням до кювети 2,0 мл $2 \cdot 10^{-3}$ M HCl на ізотонічному розчині хлориду натрія.

В досліді до 0,2 мл робочої суміші клітин в мікропробірці додавали 0,02 мл розчину досліджуваного ліку в зазначеній концентрації, обережно струшували і інкубували в термостаті при 24°C протягом 10 хвилин, після чого суміш з мікропробірки переносили до вимірювальної кювети, додавали послідовно 1,8 мл ізотонічного розчину хлориду натрія і 2 мл розчину гемолітика - соляної кислоти, після чого реєстрували модульований гемоліз.

Результати дослідження наведені в табл. 2.

Таблиця 2

Назва і форма медикаменту	Індекс Іmh	Заключення
Вітамін В1, 3% розчин	0,838	непереносність 1 типу
Вітамін В2, 1% розчин	0,575	непереносність 2 типу
Вітамін В6, 1% розчин	0,651	непереносність 2 типу
Вітамін С, 5% розчин	0,937	чутливість в межах норми
Вітамін В12, 0,01% розчин	0,660	непереносність 2 типу
Дімедрол 1% розчин	0,965	чутливість в межах норми
Новокаїн 0,5% розчин	0,845	непереносність 1 типу
Пірабутол розчин	0,744	непереносність 1 типу

На основі отриманої інформації була встановлена алергія до медикаментозних засобів і визначений рівень непереносності по кожному конкретному ліку. Було відкореговано лікування пацієнтки таким чином, що застосування препаратів – вітаміну В2, В6 і В 12 було повністю відмінено, а препарати вітамін В1, новокаїн і пірабутол були рекомендовані до відновлення під прикриттям гіпосенсибілізації дімедролом та вітаміном С. При лікуванні пацієнтки О. був зроблений акцент на вико-

ристання засобів і форм лікувальної фізкультури та фізіотерапії. Проведена медикаментозна терапія була ефективною в комплексі з альтернативним немедикаментозним лікуванням. Проявів медикаментозної непереносності не спостерігалось.

Приклад 2. Хворий К., 46 років. Клінічний діагноз: Гостра лівостороння пневмонія. Супутній діагноз: Нейроциркуляторна дистонія.

В анамнезі анафілактичний шок на введення новокаїну при видаленні хворого зуба в дитинстві.

З метою визначення можливої медикаментозної непереносності для аналізу взяли не тільки новокаїн, але й ряд інших медикаментозних засобів, а саме:

Вітамін С (Sol. Ac. ascorbinici 5% - 1 ml)

Дімедрол (Sol. Dimedroli 1% - 1 ml)

Новокаїн (Sol. Novocaini 0,5% - 1 ml)

Гентаміцин (Sol. Gentamycini sulfatis 4% - 2 ml)

Етазол (Sol. Aethazoli-natrii 10%- 5 ml)

Еуфілін (Sol. Euphyllim 2,4% 10 ml)

Діпрофілін (Sol. Diprophyllini 10% - 5 ml)

Амідопірин (Sol. Amidopyrini 4% - 5 ml).

За вищеописаною методикою спочатку готували робочий розчин крові на ізотонічному розчині хлориду натрія в розведенні 1:10 проводили дослідження медикаментозної чутливості в реакції модульованого кислотного гемолізу.

Результати дослідження представлені в табл. 3.

Таблиця 3

Назва і форма медикаменту	Індекс Іmh	Заключення
Вітамін С, 5% розчин	0,960	чутливість в межах норми
Дімедрол 1 % розчин	0,575	чутливість в межах норми
Новокаїн 0,5% розчин	0,924	чутливість в межах норми
Гентаміцин 4% розчин	0,915	чутливість в межах норми
Етазол, 10% розчин	0,923	чутливість в межах норми
Еуфілін, 2,4% розчин	0,917	чутливість в межах норми
Діпрофілін, 10% розчин	0,908	чутливість в межах норми
Амідопірин, 4% розчин	0,892	непереносність 1 типу

На основі отриманої інформації була встановлена відсутність алергії до більшості ліків, в тому числі - до новокаїну. Деяко підвищена чутливість до амідопірину носить несуттєвий характер.

Лікування основного захворювання ін'єкціями антибіотиків, розведених новокаїном, проходило без будь-яких ускладнень алергічного порядку і закінчилось повним одужанням пацієнта.

На основі співставлення даних лабораторного дослідження 34 осіб з алергією до різних медикаментів з характером клінічних проявів у вигляді симптомів медикаментозної непереносності розроблені критерії оцінки статусу індивідуальної медикаментозної непереносності по величині індекса Іmh з виділенням двох типів медикаментозної не-

переносності (табл. 4), які вимагають відповідної корекції медикаментозно терапії.

Таблиця 4

Значення індекса Imh	Категорії статусу індивідуальної медикаментозної непереносності
0,900 і вище	резистентність еритроцитів і рівень індивідуальної чутливості до медикаментів в межах умовної норми
0,725-0,899	понижена резистентність еритроцитів - підвищений рівень чутливості до медикаментозного засобу: медикаментозна непереносність 1 типу
0,724 і нижче	низька резистентність еритроцитів - низький рівень чутливості до медикаментозного засобу: медикаментозна непереносність 2 типу

Алгоритм автоматизованої оцінки індивідуальної чутливості до медикаментів полягає в графічній побудові модульованого під впливом молекул медикаментозної речовини гемолітичного процесу у вигляді кривої та наступному порівнянні її з контрольною кривою у даного пацієнта. Передбачена можливість порівняння отриманої кривої 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, що також значно підвищує оперативність та інформативність клініко-лабораторного дослідження.

Зазначені критерії оцінки медикаментозної чутливості покладені в основу алгоритму визначення статусу індивідуальної медикаментозної чутливості (непереносності) з видачею практичних рекомендацій. Принципово їх суть полягає в тому, що при медикаментозній непереносності 1 типу застосування відповідних ліків можливе під прикриттям гіпо-сенсibiliзуючих засобів, тоді як при непереносності 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, використанням розведень нативної крові в ізотонічному розчині натрію хлориду при проведенні тестових проб на основі реакцій кислотного гемолізу досягають високого рівня точності діагностичної проби на індивідуальну чутливість до медикаментозних засобів та технологічності.

З наведених прикладів видно, що використання запропонованого способу дає можливість з високою точністю і оперативністю визначати рівень індивідуальної чутливості пацієнтів до різних водорозчинних медикаментозних засобів, що має суттєве значення для попередження небезпечних для здоров'я і життя ускладнень, а для ефективного оздоровлення застосовувати альтернативні форми і методи медикаментозного і немедикаментозного лікування.

Можливі напрямки способу визначення індивідуальної медикаментозної чутливості.

Діагностична значимість способу, оснований на принципі визначення модуляторного ефекту будь-якої водорозчинної речовини на перебіг стандартної тестової реакції, може мати позитивний розвиток не тільки в клінічній медицині, але й в практиці токсикологічної, екологічної та судово-медичної експертизи.

По мірі накопичення інформації в банку даних ПЕОМ з уточненням і розширенням реєстру стандартів, по-перше, буде постійно зростати точність лабораторного визначення стану індивідуальної алергічної гіперчутливості до ліків; по-друге, буде сформоване підґрунтя для узагальненої оцінки побічних ефектів найрізноманітніших водорозчинних медикаментозних засобів, що може стати одним із визначальних моментів подальшого розвитку фармакології і фармацевтичної промисловості.

Джерела інформації

1. Гурін Н.Г., Чижевская В.С., Концевая Н.С. Реакция лейколизиса в диагностике аллергии к антибактериальным препаратам в пульмонологии. Антибиотики (Москва), 1978, № 12. - С. 1102-1108.

2. Демьяненко С.М. Автоматизированная оценка индивидуальной лекарственной чувствительности. - Лаб. дело, 1988, № 3. - С. 41-43.

ДП "Український інститут промислової власності" (Укрпатент)
Україна, 01133, Київ-133, бульв. Лесі Українки, 26
(044) 295-81-42, 295-61-97

Підписано до друку _____ 2002 р. Формат 60x84 1/8.
Обсяг _____ обл.-вид. арк. Тираж 35 прим. Зам. _____

УкрІНТЕІ, 03680, Київ-39 МСП, вул. Горького, 180.
(044) 268-25-22
