



УКРАЇНА

(19) UA (11) 22360 (13) A

(51) G 01 N 33/53

ДЕРЖАВНЕ  
ПАТЕНТНЕ  
ВІДОМСТВООПИС ДО ПАТЕНТУ  
НА ВІНАХІДбез проведення експертизи по суті  
на підставі Постанови Верховної Ради України  
№ 3769 XII від 23 XII 1993 рПублікується  
в редакції заявника

(54) СПОСІБ ДИФЕРЕНЦІЙНОЇ ОЦІНКИ ВПЛИВУ ЛІКАРСЬКИХ ПРЕПАРАТІВ НА ОРГАНІЗМ ЛЮДИНИ

(21) 97031469

(22) 28.03.97

(24) 03.03.98

(46) 30.06.98. Бюл. № 3

(47) 03.03.98

(72) Козар Валентина Вікторівна, Топчій  
Іван Іванович

(73) Козар Валентина Вікторівна

(57) Способ дифференциальной оценки влияния лекарственных препаратов на организм человека, включающий приготовление суспензии лимфоцитов, разведение исследуемого лекарственного препарата и контрольной пробы, активацию рецепторов лимфоцитов, постановку реакции активного розеткообразования, оценку реакции активного розеткообразования для определения

лекарственной аллергии, отличающийся тем, что при приготовлении суспензии лимфоцитов и разведении лекарственного препарата и контрольной пробы используют изотонический раствор хлорида натрия, разведение лекарственного препарата в изотоническом растворе осуществляют из расчета индивидуальной суточной дозы для пациента, активацию рецепторов проводят путем смешивания суспензии лимфоцитов и разведенного лекарственного препарата, при оценке реакции активного розеткообразования дополнительно определяют наличие иммунотоксической реакции к лекарственному препарату при снижении содержания розеткообразующих клеток на 11% и менее относительно того же результата в контрольной пробе.

Изобретение относится к медицине, в частности к иммунологии и аллергологии, и может быть использовано для определения индивидуальной чувствительности к лекарственным препаратам, аллергенам в стационарных и амбулаторных условиях

Известен способ оценки лекарственной аллергии в реакции активного розеткообразования [Порядин Г. В., Салмаси Ж. М. и др. // Иммунология. - 1988. - № 5 - С 52-54] (прототип), по которому выделяют суспензию лимфоцитов из венозной крови пациента, готовят взвесь лимфоцитов на среде 199 (среда для культуры клеток) в концентрации

$3 \times 10^6$  клеток) мл по известной методике. Затем готовят исследуемую пробу путем разведения лекарственного препарата (антибиотика) в среде 199 в концентрации 200 нм лекарственного препарата на 1 мл крови обследуемого пациента. Для активации рецепторов лимфоцитов готовят смесь из суспензии лимфоцитов, разведенного лекарственного препарата и пула (смеси) донорской крови IV группы. Инкубируют полученную смесь при температуре  $37^\circ\text{C}$  в течение 15 минут, добавляют эритроциты барана с использованием среды 199 (0,4%), центрифугируют смесь при

(19) UA (11) 22360 (13) A

200 G в течение 5 минут, после чего вторично проводят инкубацию в течение 10 минут, фиксируют исследуемую пробу глутаровым альдегидом, промывают пробу дистиллированной водой и окрашивают краской Задорного-Дозморова.

В качестве контрольной пробы используют выделенную суспензию лимфоцитов, которую смешивают с пулом донорской крови IV группы и средой 199 и осуществляют ее постановку реакции активного розеткообразования.

Далее осуществляют постановку реакции активного розеткообразования исследуемой и контрольной проб и производят учет количества розеткообразующих клеток в указанных пробах путем микроскопирования. При увеличении в исследуемой пробе розеткообразующих клеток на 11% и более относительно контрольной пробы судят о лекарственной аллергии к антибиотику.

К недостаткам прототипа можно отнести его следующие особенности:

использование среды 199 для приготовления взвеси лимфоцитов и разведения лекарственного препарата, так как среда 199 содержит фенол, синтетические аминокислоты, которые применяют для исследования культур *in vitro*, что может вызвать побочные явления в случае исследования крови *in vivo*;

известный способ предусматривает использование лекарственного препарата в одинаковой концентрации для всех обследуемых больных, что не позволяет осуществить индивидуальную оценку влияния назначенной терапевтической дозы препарата для каждого обследуемого;

для активации рецепторов готовят смесь, в состав которой входит 20% пул сыворотки донора IV группы крови, что усложняет способ, а кроме того, может отрицательно влиять на достоверность результата из-за возможной сенсибилизации рецепторов лимфоцитов чужеродной сывороткой;

известный способ предусматривает определение только лекарственной аллергии, например к антибиотикам, что сужает его функциональные возможности; лекарственные препараты могут оказывать и индивидуальные побочные действия в зависимости от состояния иммунной системы организма.

Задача изобретения – расширение функциональных возможностей способа и использование его для дифференцированной оценки влияния лекарственных препаратов на организм человека.

Для решения поставленной задачи авторами предложен способ дифференци-

альной оценки влияния лекарственных препаратов на организм человека, включающий приготовление суспензии лимфоцитов, разведение исследуемого лекарственного препарата и контрольной пробы. Затем проводят активацию рецепторов лимфоцитов, постановку реакции активного розеткообразования и оценку реакции розеткообразования для определения лекарственной аллергии. При приготовлении суспензии лимфоцитов и разведении исследуемого лекарственного препарата и контрольной пробы используют изотонический раствор хлорида натрия. Разведение лекарственного препарата в изотоническом растворе осуществляют из расчета индивидуального суточного дозирования для пациента.

Активизацию рецепторов проводят путем смешивания суспензии лимфоцитов и разведенного лекарственного препарата. При оценке реакции активного розеткообразования дополнительно судят об иммунологической реакции к лекарственному препарату при снижении содержания розеткообразующих клеток на 11% и менее относительно того же результата в контрольной пробе.

Отличительными признаками изобретения являются:

при приготовлении суспензии лимфоцитов и разведении лекарственного препарата и контрольной пробы используют изотонический раствор хлорида натрия;

разведение лекарственного препарата в изотоническом растворе осуществляют из расчета индивидуальной суточной дозы для пациента;

активизацию рецепторов проводят путем смешивания суспензии лимфоцитов и разведенного лекарственного препарата;

при оценке реакции активного розеткообразования дополнительно определяют наличие иммунотоксической реакции к лекарственному препарату при снижении содержания розеткообразующих клеток на 11% и менее относительно того же результата в контрольной пробе.

Использование изотонического раствора хлорида натрия для приготовления суспензии лимфоцитов и разведения исследуемого лекарственного препарата обусловлено тем, что этот раствор является составной частью крови тканевых жидкостей организма, что предотвращает возникновение неспецифических реакции т. е. побочных явлений.

Разведение исследуемого лекарственного препарата из расчета его суточной дозы для пациента позволяет оценить влия-

ние назначенного лекарственного средства непосредственно на данного пациента, что дает возможность повысить достоверность способа.

Проведении активации рецепторов без участия 20%-ного пула сыворотки крови IV группы крови упрощает способ исследования и предотвращает неспецифическую сенсбилизацию рецепторов лимфоцитов чужеродной сывороткой.

Введение дополнительного признака оценки влияния лекарственного препарата, а именно наличия иммунотоксической реакции к нему, расширяет функциональные возможности способа и позволяет подобрать индивидуальную адекватную терапию.

Отличительные признаки предложенного решения соответствуют критерию "новизна" и требованиям изобретательского уровня.

Исследования по заявляемому способу проведены на базе Харьковской областной больницы и в отделении нефрологии клиники Института терапии АМН Украины (г. Харьков) на 100 больных. Достоверность способа составляет 90–95%.

Использование предложенного способа в медицинской практике позволит расширить функциональные возможности способа, повысить достоверность исследования, предотвратить побочные явления при лечении, снизить стоимость химических реактивов и упростить методику эксперимента.

Заявляемый способ осуществляют следующим образом:

1. Выделяют суспензию лимфоцитов из венозной гепаринизированной крови пациента на градиенте плотности фико-верографии (1,077 г/см<sup>3</sup>) по известной методике.

2. В качестве раствора для приготовления суспензии лимфоцитов используют изотонический раствор хлорида натрия с pH 7,2–7,4.

3. Готовят пробу из исследуемого лекарственного препарата, например инсулина, антибиотика, анальгетиков и др., с использованием изотонического раствора хлорида натрия в концентрации 0,9% из расчета индивидуальной суточной дозы препарата для обследуемого больного.

4. Осуществляют активацию рецепторов лимфоцитов и разведенного лекарственного препарата, приготовленных по пп. 2,3.

5. Инкубируют полученную смесь при температуре 37°C в течение 15 минут.

6. Добавляют к полученной смеси 0,05 мл эритроцитов барана, центрифугируют смесь при 200 G в течение 5 минут.

7. Вторично инкубируют смесь при температуре 37°C в течение 10 минут.

8. Фиксируют исследуемую пробу – смесь глутаровым альдегидом в количестве 0,05 мл в концентрации 1,5% в течение 15 минут при комнатной температуре.

9. Промывают пробу дистиллированной водой и окрашивают краской Задорожного-Дозморова.

10. В качестве контрольной пробы используют выделенную суспензию лимфоцитов по п. 1, 2, которую смешивают с раствором хлорида натрия в количестве 0,05 мл.

11. Производят учет количества розеткообразующих клеток в контрольной и исследуемой пробах путем микроскопирования.

12. Судят о лекарственной аллергии к исследуемому препарату при увеличении в исследуемой пробе розеткообразующих клеток на 11% и более относительно контрольной пробы.

13. Дополнительно определяют иммунотоксическую реакцию к исследуемому лекарственному препарату при снижении содержания розеткообразующих клеток на 11% и менее относительно того же результата в контрольной пробе.

Возможность осуществления предложенного способа подтверждается примерами.

**Пример 1.** Больной Ш., 45 лет, поступил в отделение нефрологии клиники Института терапии АМН Украины с диагнозом: сахарный диабет инсулинзависимый (ИЗ) средней степени тяжести. Нефроангиосклероз, хроническая почечная недостаточность (ХПН) I стадии.

До поступления в клинику больной Ш. принимал длительно (более года) инсулин Депо-Н. После приема инсулина отмечены признаки аллергии: зуд без кожных проявлений. Прием антигистаминного препарата, например супрастина, зуд не устранил.

Больному Ш. проведено исследование-тест по заявляемому способу для оценки влияния препаратов инсулина на его организм. По результатам исследования содержание розеткообразующих клеток, %:

В контрольной пробе 57

В исследуемой пробе,

содержащей инсулин Депо-Н 39

Таким образом, количество розеткообразующих клеток в исследуемой пробе на 18% меньше по сравнению с контрольной пробой, что свидетельствует о наличии иммунотоксической реакции инсулина Депо-Н на организм больного Ш. После ему назначили другой вид инсулина – ЛЕНТЕ и вновь повторили исследование-тест. По результатам вторичного исследования содержание розеткообразующих клеток, %:

В исследуемой пробе 63  
В контрольной пробе 57  
т е в исследуемой пробе содержание розеткообразующих клеток на 6% больше, чем в контрольной.

Результаты вторичного исследования свидетельствуют об отсутствии как аллергической, так и иммунотоксической реакции на организм больного. Он был переведен на прием инсулина ЛЕНТЕ, жалобы на зуд прекратились. Продолжительность исследования – от 3 до 4 часов.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ:** Использование предложенного простого достоверного способа иммунологического исследования позволяет предотвратить иммуно-токсическую реакцию на организм больного.

**П р и м е р 2.** Больной М., 44 лет, находился на лечении в отделении нефрологии клиники Института терапии АМН Украины с диагнозом: мочекаменная болезнь, вторичный хронический пиелонефрит в фазе обострения, ХПН – 0, т. е. нет нарушения функции почек. На догоспитальном этапе проводи-

лась антибактериальная терапия в виде антибиотиков в средней терапевтической дозе.

При поступлении больного М. в клинику отмечены признаки лекарственной аллергии: кожный зуд, сыпь. Для оценки влияния антибиотиков на организм больного М. были проведены исследования по заявляемому способу.

В таблице представлены результаты этого исследования-теста.

По результатам проведенного исследования больному М. рекомендован гентамицин для лечения хронического пиелонефрита. Продолжительность исследования от 4 до 5 часов.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ:** Заявляемый способ дифференциальной оценки влияния лекарственного препарата на организм человека позволяет своевременно подобрать индивидуальную адекватную терапию, предотвратить побочные явления и прогрессирование заболевания.

Наименование препаратов в пробах	Количество розеткообразующих клеток, %	Результаты исследования
Контрольная проба		
1. Карбенициллин	75	Лекарственная аллергия
2. Кефзол	76	Лекарственная аллергия
3. Клафоран	5	Иммунотоксическая реакция
4. Гентамицин	65	Отсутствие аллергической и иммунотоксической реакции

Упорядник

Техред М.Келемеш

Коректор О. Кравцова

Замовлення 4483

Тираж

Підписне

Державне патентне відомство України,  
254655, ГСП, Київ-53, Львівська пл., 8