



УКРАЇНА

(19) UA (11) 16502 (13) U
(51) МПК (2006)
A61B 5/145

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ІМУНОСТИМУЛЮЮЧОЇ ДІЇ ПРОТЕФЛАЗИДУ

1

2

(21) u200601168

(22) 06.02.2006

(24) 15.08.2006

(46) 15.08.2006, Бюл. № 8, 2006 р.

(72) Лемко Ольга Іванівна, Казанкевич Валентина
Петрівна, Літун Людмила Федорівна(73) НАУКОВО-ПРАКТИЧНЕ ОБ'ЄДНАННЯ "РЕА-
БІЛІТАЦІЯ" МІНІСТЕРСТВА ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я
УКРАЇНИ(57) Спосіб визначення імуностимулюючої дії про-
тефлазиду, який включає визначення загальної

окисно-відновної активності нейтрофілів у тесті відновлення нітросинього тетразолію, який відрізняється тим, що додатково встановлюють стимулюючу дію протефлазиду на нейтрофіли у спеціально визначеній концентрації, а саме - 0,025 мкл протефлазиду, який містить 0,32 мг/мл флавоноїдів в перерахунку на рутин при розведенні протефлазиду фізрозчином у співвідношенні протефлазид:фізрозчин, що становить 1:4.

Корисна модель відноситься до області медицини, зокрема клінічної імунології, і може бути використана для визначення чутливості до протефлазиду при лікуванні патологій, що супроводжуються імунодефіцитними станами.

Відомо, що в системі підтримки імунного гомеостазу організму нейтрофіли виступають як елемент першої лінії захисту, основною функцією якого є фагоцитоз [1]. Зниження фагоцитарної активності нейтрофілів ослаблює неспецифічний імунітет і є дуже важливим патогенетичним фактором розвитку багатьох патологічних станів організму людини. Крім того, нейтрофіл займає одну з найбільш активних позицій в системі клітинно-гуморальної кооперації, що робить його індикатором різних порушень імунного гомеостазу [2].

Відомо, що дуже важливу роль в процесі фагоцитозу відіграє киснево-залежна бактерицидна система фагоцитів, яка проявляється так званим "дихальним вибухом" і являє собою первинну стереотипну відповідь організму на дію чужорідного агенту [3].

Відомий універсальний метод для виявлення загальної окисно-відновлювальної активності нейтрофілів ("дихального вибуху") у тесті відновлення нітросинього тетразолію (НСТ-тест) [4].

Однак, цей метод визначає загальний рівень бактерицидної активності нейтрофілів і не дає можливості виявити функціональні резерви нейтрофілів як однієї з головних імунокомпетентних клітин та індикатора імунного гомеостазу при впливі певних імуноотропних препаратів.

В 2001 році в Україні розроблено новий вітчизняний препарат на основі диких злакових рослин,

що зареєстрований як системний протівірусний засіб, який водночас є індуктором ендogenous інтерферону, має антиоксидантну та детоксикуючу дію.

Було поставлено завдання дослідити вплив протефлазиду на киснево-залежну бактерицидну систему нейтрофілів у тесті відновлення нітросинього тетразолію і визначити на цій основі можливість підвищення функціональних резервів нейтрофілів, що в свою чергу відображає стимуляцію неспецифічної резистентності організму в цілому.

Поставлене завдання досягається таким чином, що згідно корисної моделі, спосіб визначення імуностимулюючої дії протефлазиду, який включає визначення загальної окисно-відновної активності нейтрофілів у тесті відновлення нітросинього тетразолію, який відрізняється тим, що додатково визначають стимулюючу дію протефлазиду з підбором його концентрації, при цьому використовують найбільш ефективну з них, а саме 0,025 мкл протефлазиду, який містить 0,32 мг/мл флавоноїдів в перерахунку на рутин при розведенні протефлазиду фізіологічним розчином у співвідношенні протефлазид:фізрозчин, що становить 1:4.

Запропонований спосіб має ряд суттєвих переваг над способом-найближчим аналогом, а саме: є більш точним і дає можливість визначати індивідуальну чутливість організму хворого до імуностимулюючої дії протефлазиду, що є підґрунтям для призначення саме цього препарату для корекції виявлених порушень імунітету.

Спосіб здійснюється наступним чином:

Дослідження проводяться в суспензії нейтрофілів, які виділяють із цільної крові на градієнті

(13) U
(11) 16502
(19) UA

щільності фікол-верографіну (1,093). Кров нашаровують на градієнт щільності, центрифугують при 1500 обертах на хвилину протягом 30 хвилин. Після цього клітини обережно відсмоктують пастерівською піпеткою в центрифужну пробірку і двічі відмивають у стерильному фізіологічному розчині. Відмиті клітини ресуспендують в 0,5мл фізрозчину.

На предметне скло наносять 0,5мл клітинної суспензії, додають 0,05мкл 1% розчину нітросинього тетразолію і ставлять на 15 хвилин в термостат при температурі 37°C. Після термостату зі скла струшують надосадову рідину, сушать, фіксують метанолом і фарбують нейтральним червоним. Підраховують 100 клітин нейтрофілів і визначають відсоток тих, які містять диформазиан - позитивні гранули (спонтанний НСТ-тест за відомим способом).

Згідно нашого способу, до клітинної суспензії нейтрофілів (0,1мл) додають 0,05мкл 1% розчину нітросинього тетразолію та 0,025мкл протекфлазиду з вмістом флавоноїдів 0,32мг/мл в перерахунку на рутин в певному розведенні. Отримана суміш стоїть при кімнатній температурі 10 хвилин, а далі в термостаті при температурі 37°C ще 15 хвилин. Після термостату мазок сушать, фіксують метанолом і фарбують нейтральним червоним. Підрахунок нейтрофілів, що містять диформазиан-позитивні гранули, проводять з розрахунку на 100

клітин.

З метою вибору найбільш ефективної концентрації протекфлазиду для отримання його стимулюючої дії обстежено 27 хворих з проявами вторинного імунodefіциту. Проведено експеримент із серією розведень протекфлазиду фізіологічним розчином - 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32 (табл. 1). Із наведених даних видно, що у стимульованому протекфлазидом НСТ-тесті відсоток диформазиан-позитивних клітин коливався від 23,0±2,16% до 29,5±1,78% і був найвищим при розведенні протекфлазиду фізрозчином у співвідношенні 1:4.

Функціональний резерв (приріст диформазиан-позитивних клітин в НСТ-тесті під впливом протекфлазиду) також був найвищим при використанні розведення протекфлазиду фізрозчином 1:4 і склав 6,22±0,48%.

Дослідження по відомому та новому способам проведені також у 12 практично здорових осіб. По відомому способу відсоток диформазиан-позитивних клітин в НСТ-тесті становив 25,3±0,62%, а по новому способу (стимульованому протекфлазидом) - 30,3±0,17% з функціональним резервом 5,0±0,99%.

Слід відмітити, що протекфлазид не викликає токсичної пошкоджуючої дії на суспензію клітин нейтрофілів.

Таблиця 1

Розведення протекфлазиду	Відсоток диформазиан-позитивних клітин в НСТ-тесті		Функціональний резерв, %
	спонтанному (за відомим способом), %	стимульованому (за новим способом), %	
нерозведений	22,5±2,10	23,8±2,16	0,6±0,10
1:2	22,5±2,05	24,5±1,75	2,4±0,60
1:4	22,9±1,00	29,5±1,78	6,2±0,48
1:8	22,8±1,49	22,5±1,55	2,8±0,65
1:16	21,8±1,40	22,7±1,56	1,0±0,14
1:32	22,4±1,88	22,8±2,19	0,4±0,10

Таким чином, встановлена імуностимулююча дія протекфлазиду на киснево-залежну бактерицидну систему нейтрофілів *in vitro*, що відображає його стимулюючу дію на неспецифічну резистентність організму в цілому.

Корисна модель можна використовувати для визначення індивідуальної чутливості людського організму до імуностимулюючої дії протекфлазиду з метою визначення доцільності призначення даного препарату для корекції виявлених порушень імунітету у пацієнтів з різними нозологічними формами.

Джерела інформації:

1. Блиндарь В.Н., Зубрыкина Г.Н. Современные представления о роли нейтрофилов в противоопухолевом иммунитете // Клин. лаб. диагности-

ка. - 2005. - № 8. - С. 51-54.

2. Куртасова Л.М., Шахина НА., Задорова Ю.В. Особенности функциональной активности нейтрофилов у больных atopическим дерматитом // Аллергология. - 2005. - № 1. - С. 35-39.

3. Величковский Б.Т. Молекулярные и клеточные основы экологической пульмонологии // Пульмонология. - 2000. - № 3. - С. 10-18.

4. Романишин Я.М., Темник І.В., Лаповець Л.Є. та співавт. Методичні рекомендації для оцінки імунного статусу людини: визначення факторів неспецифічної резистентності, гуморального імунітету та мікрометодів дослідження імунної системи // Методичні рекомендації. - Львів. 1999. - 29 с. - найближчий аналог.