



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **58724** (13) **U**
(51) **МПК**
A61K 8/33 (2011.01)
G01N 33/15 (2011.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ПІДБОРУ ІНДИВІДУАЛЬНОЇ ЛІКУВАЛЬНОЇ ДОЗИ ГАЗОПОДІБНИХ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН

1

(21) u2010111053

(22) 14.09.2010

(24) 26.04.2011

(46) 26.04.2011, Бюл.№ 8, 2011 р.

(72) КЛІМОВА ОЛЕНА МИХАЙЛІВНА, ДРОЗДОВА
ЛАРИСА АНАТОЛІЙВНА, ЛІСОВА ІРИНА ГРИГОРІ-
ВНА

(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ЗАГАЛЬ-
НОЇ ТА НЕВІДКЛАДНОЇ ХІРУРГІЇ АКАДЕМІЇ МЕ-
ДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ"

(57) Спосіб підбору індивідуальної лікувальної до-
зи газоподібних біологічно активних речовин, що
включає опосередковану оцінку ступеня ушко-
дження нативності мембран клітин крові, який **від-
різняється** тим, що як клітини крові вибирають
лімфоцити, виділені на градієнті густини з гепари-

2

нізованої крові пацієнта, фізіологічний розчин на-
сичують різними дозами газоподібної біологічно
активної речовини і додають його в певній кілько-
сті до серії проб сироватки крові того ж пацієнта,
потім цю суміш інкубують з виділеними лімфоци-
тами, проводять оцінку лімфоцитотоксичності
шляхом підрахунку процентного співвідношення
лімфоцитів з ушкодженими мембранами та загаль-
ної кількості лімфоцитів, при цьому, якщо рівень
лімфоцитотоксичності в пробах, оброблених ме-
дичним озonom, вище контрольної лімфоцитоток-
сичності, то дана доза озону є токсичною для паціє-
нта, а якщо вона знижує цитотоксичність
сироватки, або не змінює спонтанний рівень цито-
токсичності, то може бути рекомендована до за-
стосування даному пацієнту.

Корисна модель відноситься до медицини, ла-
бораторної діагностики і може бути використана
для підбору індивідуальної лікувальної дози газо-
подібних біологічно активних речовин, наприклад,
озону, з використанням лімфоцитотоксичного тес-
ту для хворих з різною імунореактивністю.

В медицині озон використовується у вигляді
озono-кисневої суміші для місцевого і системного
застосування. Відомо про селективну дію озону на
сполуки, які мають подвійні і трійні зв'язки. До них
відносяться білки, амінокислоти і ненасичені жирні
кислоти, що входять до складу ліпопротеїдних
комплексів плазми, ліпідного біслоя клітинних
мембран, ендогенних та екзогенних рецепторів. В
основі біологічних ефектів озонотерапії лежать
саме реакції з цими сполуками, порушення струк-
турно-функціональної організації яких мають пато-
генетичне значення при різних захворюваннях.

Прийнято використовувати озono-кисневу су-
міш з концентрацією від 0,2 до 80 мг озону на 1
літр кисню. Дуже важливим є індивідуальний підбір
дози озону для пацієнтів, що мають різні типи ме-
таболічних реакцій при різних патологіях.

Відомий спосіб визначення зміненої лімфоци-
тотоксичності, по рівню автоімунних антитіл

(Terasaki P., 1964), використання якого описано в
статті Клімової О.М., Зінченко О.К., Литовченко
Т.О., Гноєвої О.І. «Дигностическая значимость
показателей гуморального иммунитета у больных
с артериальной гипотонией в отдаленном периоде
закрытой черепно-мозговой травмы, церебраль-
ным арахноидитом и вегетативной дисфункции»
[«Врачебная практика». - 2005, №6. - С. 28-31]. Він
включає використання лімфоцитотоксичного тесту
для визначення вмісту автоімунних антитіл.

Відомий спосіб визначення автоімунних анти-
тіл, який описано в статті Клімової О.М., Цай П.А.,
Кордон Т.І. Динамика изменения иммунологичес-
ких показателей у больных после сеансов гипно-
терапии [Матеріали VI Міжнародної науково-
практичної конференції «Валеологія: сучасний
стан, напрямки та перспективи розвитку». - 2008,
Т.2. - С. 65-74].

Спосіб полягає у наступному: після поперед-
ньої годинної інкубації лімфоцитів, виділених в
градієнті густини фікол-верографін, з досліджува-
ною сироваткою в присутності білків системи ком-
плементу проводять підрахунок клітин з ушкодже-
ною клітинною мембраною після попереднього
фарбування еозином і метиленовою синькою. Клі-

(13) **U**(11) **58724**(19) **UA**

тини з ураженою автоантитілами мембраною профарбовуються більш інтенсивно ніж з неуразеною мембраною. Інтенсивно профарбовані клітини диференціюють від живих і по процентному співвідношенню уражених і живих клітин оцінюють ступінь лімфоцитотоксичності. Ступінь забарвлення залежить від ступеню ураження лейкоцитарних мембран.

В зазначеному методі не існує підбору індивідуальної терапевтичної дози газоподібної речовини для застосування *in vitro* з метою отримання оптимального терапевтичного ефекту.

Відомий спосіб визначення автоімунних антитіл базується на властивості імунної системи специфічно розпізнавати і з різною афінністю зв'язувати антигени різної природи. Імунокомпетентні лімфоцити на своїй поверхні мають рецептори, які зв'язуються з власними автоантигенами організму. Не зважаючи на те, що існують механізми, що перешкоджають виникненню імунної відповіді на власні антигени, але є висока ймовірність, що ці механізми можуть бути порушені, внаслідок чого виникають ауто антитіла, які здатні взаємодіяти з власними антигенами. Вікові зміни автоімунних антитіл асоційовані з розвитком аутоімунних процесів та іншими патологічними станами, що супроводжуються імунологічною сенситизацією. Відомий спосіб визначення ізоімунних антитіл, оснований на здібності до утворення в присутності білків системи комплементу сироваточних комплексів комплемент-антиген-антитіло, які здатні ушкоджувати мембрани лімфоцитів.

Найбільш близьким по суті і результату до корисної моделі, є процес підбору фармакологічних препаратів, який описано в роботі Малащенко І.К., Дідковський Н.А., Левко А.А. [К вопросу о значении индивидуального подбора иммунокорректоров // Фарматека. - №12 (89)]. Він включає інкубацію нейтрофілів хворих з імунокоректорами, в кінцевій концентрації від 50 до 100 мкг/мл, що відповідає розрахунковій концентрації, яка створюється в крові при введенні разової дози препарату; розрахунок коефіцієнту хемолюмінесценції за формулою $KХЛ=ИХЛ \text{ досл./ИХЛ контр.}$.

Зазначений процес дозволяє підбирати оптимальний імунокоректор, оптимізувати схему терапії, визначаючи частоту введення того чи іншого препарату по тривалості індивідуальної відповіді на нього. Однак, описаний спосіб не передбачає проведення підбору індивідуальної дози лікарських засобів, включаючи газоподібні біологічно активні речовини, зокрема, озono-кисневу суміш (медичний озон).

В основу способу підбору індивідуальної лікувальної дози газоподібних біологічно активних речовин, поставлено завдання розробки удосконаленого процесу, який дозволяє, шляхом оцінки рівня як спонтанної лімфоцитотоксичності, так і індукованої лімфоцитотоксичності різними дозами газоподібних біологічно активних речовин, індивідуально підібрати дозу одноразового введення газоподібних біологічно активних речовин із широкого діапазону концентрацій медичного озону, з урахуванням окислювально-відновного потенціалу організму.

Поставлене завдання вирішується тим, що в способі підбору індивідуальної лікувальної дози газоподібних біологічно активних речовин, який включає опосередковану оцінку ступеню ушкодження нативності мембран клітин крові, згідно з корисною моделлю в якості клітин крові обирають лімфоцити, виділені на градієнті густини з гепаринізованої крові пацієнта; фізіологічний розчин насичують різними дозами газоподібної біологічно активної речовини і додають його в певній кількості до серії проб сироватки крові того ж пацієнта, і потім цю суміш інкубують з виділеними лімфоцитами; проводять оцінку лімфоцитотоксичності шляхом підрахунку процентного співвідношення лімфоцитів з ушкодженими мембранами до загальної кількості лімфоцитів; якщо рівень лімфоцитотоксичності в пробах, оброблених медичним озonom, вище контрольної лімфоцитотоксичності, то дана доза озону є токсичною для пацієнта, а якщо вона знижує цитотоксичність сироватки, або не змінює спонтанний рівень цитотоксичності, то може бути рекомендована до застосування даною пацієнту.

Приклад конкретного застосування

Дослідження включає відбір в 4 пробірки по 1 мл сироватки крові і в 1 пробірку гепаринізованої крові пацієнта. 3 флакони по 50 мл фізіологічного розчину обробляють протягом 10 хв. при швидкості подачі озono-кисневої суміші 0,5 л/хв. Для барботажу використовується концентрація озону 10, 20, 40 мг/л. Сироватку крові пацієнтів оброблюють озонованим фізіологічним розчином. Для цього в пробірки з сироваткою крові №1, №2 та №3 вносять по 50 мкл озонованого фізіологічного розчину з різними дозами. Гепаринізовану кров розводять 1:1 забуференим фізіологічним розчином (ЗФР). Нашаровують отриманий біоматеріал на 2 мл розчину фікол-верографін ($\rho=1,077$) в центрифужній пробірці. Центрифугують пробірки 25 хв в режимі 1500 об/хв. Зливають надосадну рідину (НОР). Відбирають «лімфоцитарне кільце», що утворилося на верхній межі градієнту густини, пастерівською піпеткою і переносять в чисту центрифужну пробірку. До виділеної суспензії лімфоцитів додають 6-7 мл ЗФР, ретельно перемішують. Центрифугують пробірки 10 хв в режимі 1000-1500 об/хв. Зливають НОР. Додають до осаду 6-7 мл ЗФР. Центрифугують пробірки 5 хв в режимі 1000-1500 об/хв. Із отриманого матеріалу для виготовлення препарату використовують звісь лімфоцитів, яка містить $2 \cdot 10^6$ клітин в 1 мл (підрахунок проводиться в камері Горяєва). Проводять пробу на життєздатність лімфоцитів. Число живих клітин повинно складати не менше 95-98%. Для отримання препарату для мікроскопії в центрифужній пробірці вносять 0,1 мл звісі, додають по 0,1 мл сироватки і інкубують в термостаті протягом 30 хв при $t=37^\circ\text{C}$. У всі пробірки вносять по каплі розчину комплементу і інкубують пробірки протягом 1,5-2 годин в термостаті при $t = 37^\circ\text{C}$. Потім в кожну пробірку вносять по 1 каплі еозину і інкубують 10 хв. У всі пробірки вносять по 2 каплі азур-еозину і інкубують 1 годину.

Результати враховують шляхом підрахунку ушкоджених (профарбованих) та неушкоджених

(не профарбованих) клітин за допомогою світлового мікроскопу. Процентне співвідношення профарбованих лімфоцитів до загальної кількості лімфоцитів характеризує рівень лімфоцитотоксичності. Оскільки лімфоцитотоксичність є опосередкованою характеристикою дії ізоіммунних антитіл на клітинні мембрани лімфоцитів *in vitro*, то ступінь її підвищення або зниження може характеризувати ступінь індукції аутолізу клітин в присутності різних доз озону. Про рівень ізоіммунних аутоантитіл судили по ступеню лімфоцитотоксичного ефекту на мембрани лімфоцитів в нативних зразках і після обробки сироватки крові озоном.

Якщо рівень лімфоцитотоксичності в препаратах, оброблених озоном, вище контрольної лімфоцитотоксичності, то дана доза озону є токсичною для пацієнту. А якщо вона модифікує компоненти сироватки і тим самих знижує її цитотоксичність, то для клінічного застосування пацієнту показана саме ця доза озону, або та, що не підвищує спонтанний рівень цитотоксичності.

Методика передбачає можливість оцінки як спонтанної лімфоцитотоксичності, так і індукованої лімфоцитотоксичності біотичними і абіотичними факторами середовища.

Підбір дози озону базується на порівняльній оцінці їх впливу на зміну нативності або індукції надмірної деструкції клітинних мембран клітин крові (лімфоцитів).

Приклад

Хвора Л., 56 років, діагноз - флегмона нижньої щелепи.

Лікарем призначено озонотерапію. Підбір оптимальної дози озону проводився за допомогою описаного вище способу. Для барботажу фізіологічного розчину використовували концентрацію озону 10, 20 та 40 мг/л. Результати проведеного дослідження показали, що спонтанна лімфоцитотоксичність сироватки хворої становила 47%. Лімфоцитотоксичність у пробах з додаванням фізіологічного розчину, обробленого різними дозами озону була наступною: в пробі обробленій фізіологічним розчином з концентрацією озону 10 мг/л рівень лімфоцитотоксичності становив 45%, що не відрізняється від спонтанної лімфоцитотоксичності сироватки хворої; в пробі обробленій фізіологічним розчином з концентрацією озону 20 мг/л рівень лімфоцитотоксичності становив 29%, що достовірно нижче спонтанної лімфоцитотоксичності; в пробі обробленій фізіологічним розчином з концентрацією озону 40 мг/л рівень лімфоцитотоксичності становив 41%, що незначно відрізняється від рівня спонтанної лімфоцитотоксичності. Оскільки, концентрацією озону 20 мг/л позитивно модифікує цитотоксичні компоненти сироватки і тим самих знижує її цитотоксичність, то для клінічного застосування пацієнту показана саме ця доза озону.