



УКРАЇНА

(19) UA (11) 35321 (13) A

(51) G A61B10/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВІНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ СТАНУ ІНДИВІДУАЛЬНОЇ РЕАКТИВНОСТІ ОРГАНІЗМУ

(21) 99095229

(22) 21.09.1999

(24) 15.03.2001

(46) 15.03.2001, Бюл. № 2, 2001 р.

(72) Бондаренко Надія Миколаївна, Барінов Едуард Федорович, Абрамець Ігор Ігоревич, Зябіцев Сергій Володимирович, Максютенко Сергій Іванович, Барінова Марія Едуардівна, Ковальчук Наталя Василівна, Терещук Богдан Петрович
(73) ДОНЕЦЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. М.ГОРЬКОГО

(57) Спосіб визначення стану індивідуальної реактивності організму шляхом дослідження ізольованих клітин крові, який відрізняється тим, що оцінюють адренореактивність тромбоцитів до і після введення в організм блокатора циклооксигенази, наприклад аспіріну, відтворюють криву доза-відповідь і у випадку її зсуву вліво на 10-30% у порівнянні з вихідними значеннями діагностують стан нормального, вище 30% - підвищеного, а вправо більш, ніж на 10% - стан зниженої індивідуальної реактивності організму.

Спосіб визначення стану індивідуальної реактивності організму має відношення до галузі медицини та біології, зокрема, клінічної фізіології, і може бути використаний для оцінки індивідуальної реактивності організму по ізольованим клітинам крові в умовах поліклініки або стаціонару.

Відомий спосіб визначення стану «загальної» реактивності організму [1 Васильев В.С., Васильева А.Н. Способ определения общей реактивности организма / Авторское свидетельство СССР №1274681. - М. Кл. А 61 В 10/00. - Бюл. - 1986. - № 45], шляхом внутрішньошкірного введення пірогена в дозі 1-2,5 МПД і при розмірах еритеми від 4 до 10 мм діагностують нормальну загальну реактивність, при значеннях більш 10 мм - підвищену, а при значеннях менше 4 мм - знижену загальну реактивність організму.

Недоліком відомого способу є високий ступінь похибки і складність діагностики, яка пов'язана з тим, що для оцінки стану «загальної», а за сутністю - імунної, реактивності організму використовується такий непрямий метод, як вимірювання діаметра еритеми (термін «загальна» реактивність не коректно використаний авторами, оскільки така дефініція відсутня в існуючих класифікаціях реактивності організму). Особливо наочно зазначений недолік виявляється у випадку, якщо ділянка шкіри, в якій є запалення (еритема), не має класичної форми кола. Такий спосіб також не дозволяє враховувати резервні можливості реактивності організму, що виключає можливість її адекватної корекції, заради якої найчастіше проводиться таке дослідження.

Найбільше близьким за технічною сутністю до способу, що заявляється, є спосіб виявлення реактивності імунної системи до дії стрес-чинників [2 Баева Е.В., Арестова З.Я. Способ определения стресс-реактивности животных / Авторское свидетельство СССР №1716448 - М. Кл. G 01 N 33/53. - Бюл. - 1992. - № 8] шляхом вивчення ізольованих клітин крові зокрема, визначення рівня бласттрансформації лімфоцитів до і після впливу стрес-чинників, і при зниженні цього показника до 30% після впливу стресора в порівнянні з пробою до його впливу визначають високу стрес-реактивність тварини, а при рівні бласттрансформації нижче 30% - низьку стрес-реактивність.

Відомий спосіб забезпечує оцінку реактивності імунної системи організму на основі вивчення ступеня бласттрансформації лімфоцитів in vitro до і після впливу стресового чинника in vivo і має ряд обмежень. Описаний підхід базується на факті перебудови метаболізму лімфоцитів під час активації симпат-адреналової системи за умов стрес-реакції і відбиває стан специфічної резистентності організму.

Недоліки способу полягають у тому, що, по-перше, не враховується можливість модуляції хемосензитивності (чутливості) рецепторів, зокрема, з боку метаболітів арахідонової кислоти. Останні розглядаються не тільки як важливий чинник, що лімітує стрес-реакції, але і як найважливіший регулятор міжклітинної взаємодії, що визначає ступінь індивідуальної реактивності організму. Випадання з аналізу цієї ланки відзначається на точності способу, так за запропонованим способом не

(19) UA (11) 35321 (13) A

діагностується нормальний рівень реактивності організму. По-друге, використання стрес-реакції в якості «обурюючого» чинника, спроможного змінити індивідуальну реактивність організму, накладає визначені обмеження на застосування цього способу серед людей, тим більше у хворих, оскільки важко дозувати силу впливу і контролювати плин побічних негативних реакцій (наприклад, виникнення вазоконстрикції). По-третє, спосіб має обмежені можливості діагностики, оскільки дозволяє оцінити тільки імунологічну реактивність, яка є одним з елементів індивідуальної реактивності організму. По-четверте, недоліками описаного способу є складність (багатостадійність) і тривалість постановки реакції бласттрансформації лімфоцитів.

Так, за нашими даними, можливість визначення індивідуальної реактивності організму за описаним вище способом не перевищує 50%.

В основу винаходу поставлена задача визначення стану індивідуальної реактивності організму шляхом дослідження ізольованих клітин крові, оцінки адренореактивності тромбоцитів до- і після введення в організм блокатора циклооксигенази, наприклад аспірину, відтворення кривої доза-відповідь і у випадку її зсуву вліво на 10-30% у порівнянні з вихідними значеннями діагностують стан нормальної, вище 30% - підвищеної, а вправо більш, ніж на 10% - стан зниженої індивідуальної реактивності організму, що дає можливість оцінити ступінь модуляції хемосензитивності рецепторів клітин досліджуваного організму.

Сутність способу, що заявляється, складається з дослідження ізольованих клітин крові, оцінки адренореактивності тромбоцитів до- і після введення в організм блокатора циклооксигенази, наприклад аспірину, відтворення кривої доза-відповідь і у випадку її зсуву вліво на 10-30% у порівнянні з вихідними значеннями діагностують стан нормальної, вище 30% - підвищеної, а вправо більш, ніж на 10% - стан зниженої індивідуальної реактивності організму.

Новим у способі, що заявляється, є те, що досліджують адренореактивність тромбоцитів до- і після введення в організм блокатора циклооксигенази, наприклад аспірину, відтворюють криву доза-відповідь і у випадку її зсуву вліво на 10-30% у порівнянні з вихідними значеннями діагностують стан нормальної, вище 30% - підвищеної, а вправо більш, ніж на 10% - стан зниженої індивідуальної реактивності організму.

Розробка способу, що заявляється, стала можливою завдяки таким науковим фактам. По-перше, найбільше точним критерієм оцінки функціонального стану клітин-цільей і, відповідно, стану індивідуальної реактивності організму, є дослідження їхнього рецепторного апарату за допомогою відповідних агоністів або антагоністів. Як показали наші дослідження, зміна значень кривої доза-відповідь до- і після моделювання порушень реактивності організму (виникання симпато-адреналової системи шляхом введення експериментальним тваринам гуанідину, гіперкальціємія, травматичний шок тощо), є інтегративним відбитком можливостей модуляції хемосензитивності рецепторів клітин досліджуваного організму.

По-друге, уявляється можливим за допомогою аспірину (блокатор циклооксигенази - внутрішньоклітинного ферменту, що бере участь у метаболізмі арахідонової кислоти), оцінити ступінь модуляції хемосензитивності рецепторів клітин досліджуваного організму. Так, після одноразового введення щурам аспірину в стандартній дозі 10 мг/кг маси індивідуальна реактивність організму знижується на 20-30%. В основі такого явища лежить нівелювання модуляції хемосензитивності рецепторів різних клітин-цільей, про що може свідчити виявлене нами через 60 хв збільшення відношення циклічних аденозинмонофосфата і гуанозинмонофосфата (цАМФ/цГМФ) у клітинах крові (тромбоцитах, моноцитах і лімфоцитах) досліджуваних тварин. Через 6-24 годин абсолютний вміст цАМФ і цГМФ у тромбоцитах змінюється за різним ступенем, завдяки чому відношення цАМФ/цГМФ відновлюється до вихідного рівня. Новий рівень вторинних месенджерів є наслідком генетично детермінованої реалізації «структурного сліду» в організмі.

Вторинні месенджери забезпечують реалізацію адаптаційних реакцій клітини, отже, визначають стан індивідуальної реактивності організму. Всяка штучна спроба змінити якісну або кількісну відповідь адаптаційної реакції організму супроводжується прагненням його регулюючих систем (гуморальної, нервової або імунної) відновити вихідний стан. При цьому *in vivo* є всі необхідні для цього умови (наявність функціонального зворотного зв'язку, субстратів окислення, O_2 , агоністів різних рецепторів тощо). Врахування функціональної відповіді ізольованих клітин не може бути значущим без урахування резервних можливостей регулюючих систем організму.

Сполучення в межах способу етапів дослідження *in vivo*, що дозволяє оцінити наслідки вмикання резервної потужності регулюючих систем організму, з аналізом функціональної відповіді клітин *in vitro* забезпечує оцінку ступеня модуляції хемосензитивності рецепторів клітин досліджуваного організму.

Досягнення технічного результату даного способу засновано на оцінці *in vitro* адренореактивності тромбоцитів до- і після введення в організм блокатора циклооксигенази, що дозволяє запустити процес формування внутрішньоклітинного «структурного сліду». Наші дослідження показали, що, якщо на цьому фоні оцінювати розмір і напрям зсуву значень кривої доза-відповідь тромбоцитів, то точність збігу результатів, отриманих *in vitro*, з клініко-лабораторними даними визначення стану індивідуальної реактивності організму підвищується до 90%.

Реалізують спосіб таким чином.

У хворого беруть венозну кров у силіконову пробірку з 3,8% лимоннокислим натрієм у пропорції 9:1. Збагачену тромбоцитами плазму (ЗТП) одержували шляхом центрифугування крові протягом 10 хв із швидкістю 1000 об/хв, тромбоцитарний осадок - центрифугуванням збагаченої тромбоцитами плазми протягом 15 хв із швидкістю 3000 об/хв. Отриманий осадок ресуспендували в плазмі, що бідна на тромбоцити, до концентрації 1×10^7 у 1 мл. Агрегацію та дезагрегацію тромбоцитів реєстрували модифікованим методом Born

et Howard шляхом вимірювання оптичної щільності світлового потоку, що проходить через суспензію клітин, на спектрофотометрі СФ-46. Перше (вихідне) дослідження проводять до введення в організм блокатора циклооксигенази - аспірину. У 1-й серії тестів до клітин додають 0,1 мл фізіологічного розчину (1-й контроль), у 2-й серії в кожну пробу з суспензією тромбоцитів вводять по 0,1 мл ізадрина, кінцева концентрація якого відповідно складає 10, 25 і 50 мкмоль/л. Проби інкубують при 20°C протягом 8-9 хв, після чого визначають ступінь дезагрегації тромбоцитів у кожній пробі і за отриманими значеннями будують криву доза-відповідь. Повторне аналогічне дослідження проводять через 6-24 годин після прийому аспірину в дозі 1 г на 70 кг маси. Оцінюють дозозалежний напір зсуву і розмір зміни адренореактивності тромбоцитів, використовуючи побудовану криву доза-відповідь. Якщо відбувається зсув значень кривої доза-відповідь вліво на 10-30% у порівнянні з вихідними значеннями, то діагностують стан нормальної, вище 30% - підвищеної, а вправо більш ніж на 10% - стан зниженої індивідуальної реактивності організму.

Загоєння шкірної рани є класичним прикладом відбитка стану індивідуальної реактивності організму. Цей процес обраний в якості об'єктивного критерію стану індивідуальної реактивності організму в конкретних прикладах реалізації способу, що заявляється.

Приклад 1.

Хворий Н., 35 років, надійшов у хірургічне відділення з діагнозом гострий апендицит. Висновок патоморфологічного дослідження підтвердив клінічний діагноз. До оперативного втручання з венозної крові методом диференційованого центрифугування виділяли тромбоцити, у кожну пробу із суспензією тромбоцитів вводили по 0,1 мл ізадрина в кінцевій концентрації 10, 25 і 50 мкмоль/л. Проби інкубували при $t=20^{\circ}\text{C}$ протягом 8-9 хв після чого визначали ступінь дезагрегації тромбоцитів, що відповідно склала 15%, 31% і 43%. Виконана апендектомія. У ранньому післяопераційному періоді до складу комплексної терапії був включений нестероїдний протизапальний препарат - аспірин (2 г/добу) з метою прогнозування загоєння рани, виходячи з визначення стану індивідуальної реактивності організму за запропонованим нами способом. Через 24 години повторно проводили аналогічний тест із зростаючими концентраціями ізадрина. Отримано такі результати при концентрації ізадрина 10, 25 і 50 мкмоль/л ступінь дезагрегації тромбоцитів склав відповідно 27%, 41% і 54%. Ці дані свідчать, що крива доза-відповідь зміщується вліво і розмір значень зсуву знаходиться в межах 10-12% - це відповідає стану нормальної індивідуальної реактивності організму і дозволяло прогнозувати нормальний плин репаративних процесів в області операційної рани. Прогноз збігався з клінічними спостереженнями - плин післяопераційного періоду без ускладнень, рана зажила первинним натягом, шви зняті на 7-й день після операції.

Приклад 2.

Хворий П., 27 років, надійшов у хірургічне відділення з діагнозом гострий апендицит який підтверджено наступним патоморфологічним дос-

лідженням - флегмонозний апендицит. До оперативного втручання з венозної крові методом диференційованого центрифугування виділяли тромбоцити у кожну пробу з суспензією тромбоцитів вводили по 0,1 мл ізадрина в кінцевій конц., концентрації 10, 25 і 50 мкмоль/л. Проби інкубували при $t=20^{\circ}\text{C}$ протягом 8-9 хв після чого визначали ступінь дезагрегації тромбоцитів що відповідно склала 18%, 27% і 42%. Виконана апендектомія. У ранньому післяопераційному періоді до складу комплексної терапії був включений нестероїдний протизапальний препарат - аспірин (2 г/добу) із метою прогнозування загоєння рани виходячи з визначення стану індивідуальної реактивності організму за запропонованим нами способом. Через 24 години повторно проводили аналогічний тест із зростаючими концентраціями ізадрина. Отримано такі результати при концентрації ізадрина 10, 25 і 50 мкмоль/л ступінь дезагрегації тромбоцитів склав відповідно 48%, 63% і 76%. Ці дані свідчать, що крива доза-відповідь зміщується вліво і розмір значень зсуву знаходиться в межах 30-36% - це відповідає стану підвищеної індивідуальної реактивності організму і дозволяло прогнозувати відхилення від нормального плину репаративних процесів в області операційної рани. На 3-ю добу післяопераційного періоду в животі з'явився біль невизначеного характеру, а потім в області рани підвищилася температура тіла до $37,7^{\circ}\text{C}$ між швами рани з'явився серозно-кров'янистий ексудат. До 5-ї доби болю в області рани зростали, з'явилися нудота і блювота. Під час ревізії рани виділилося до 80 мл гнійного ексудату. Широке розведення країв рани дало можливість розкрити гнійні кишені, некротизовані ділянки рани висічені, оброблені антисептичними препаратами. Рана гоїлася довгостроково місцево застосовували протеолітичні ферменти, на 11-у добу накладені вторинні шви.

Приклад 3.

Хворий С., 68 років, надійшов у хірургічне відділення з діагнозом хронічний апендицит. Дані патоморфологічного дослідження підтвердили клінічний діагноз. До оперативного втручання з венозної крові методом диференційованого центрифугування виділяли тромбоцити у кожну пробу із суспензією тромбоцитів вводили по 0,1 мл ізадрина в кінцевій концентрації 10, 25 і 50 мкмоль/л. Проби інкубували при $t=20^{\circ}\text{C}$ протягом 8-9 хв, після чого визначали ступінь дезагрегації тромбоцитів що відповідно склала 27%, 46% і 65%. Виконана апендектомія. У ранньому післяопераційному періоді до складу комплексної терапії був включений нестероїдний протизапальний препарат - аспірин (2 г/добу) з метою прогнозування загоєння рани, виходячи з оцінки загальної реактивності організму за запропонованим нами способом. Через 24 години повторно проводили аналогічний тест із зростаючими концентраціями ізадрина. Отримано такі результати при концентрації ізадрина 10, 25 і 50 мкмоль/л ступінь дезагрегації тромбоцитів склав відповідно 22%, 37% і 55%. Оскільки крива доз-відповідь зміщується вправо, а розмір значень зсуву знаходиться в межах 5-10% то можна діагностувати стан зниженої індивідуальної реактивності організму і прогнозувати затяжний плин репаративних процесів в області операційної рани. Цей прогноз співпав із клінічними спостереженнями.

ми: на 11-у добу після операції в хворого посилпилися болі в області рани, підвищилася температура тіла до 37,2-37,5°C. при огляді операційної рани виявлена гіперемія і набряклість її країв, пальпаторно визначалося хворобливе ущільнення по ходу рани, що свідчило про утворення післяопераційного запального інфільтрату. При ревізії операційної рани виявлено невелику кількість гнійного ексудату, що зібрався в підшкірній основі. Після обробки рани антисептичними препаратами були накладені вторинні шви.

Таким чином, приведені клінічні дані, що відбуваються загосня операційної рани, збігаються з прогнозом ефективності репаративних процесів у пацієнтів, побудованим на оцінці адренореактивності тромбоцитів, що свідчить про високу інформативність запропонованого способу визначення стану індивідуальної реактивності організму.

Перевага способу, що заявляється, складається в тому, що він технічно простий, економіч-

ний, інформативний, скорочує час і матеріальні витрати на проведення досліджень і є об'єктивним способом визначення стану індивідуальної реактивності організму.

Перераховані переваги визначають перспективність застосування методу в клінічній практиці для індивідуалізації діагностики і лікування хворих.

Іспити способу, що заявляється, проведені на 45 пацієнтах, що знаходилися на лікуванні з приводу різних гострих і хронічних запальних захворювань.

Джерела інформації, що прийняті до уваги:

1. Васильев В.С., Васильева А.Н. Способ определения общей реактивности организма / Авторское свидетельство СССР №1274681. - М. Кл. А 61 В 10/00. - Бюл. - 1986. - № 45.

2. Беева Е.В., Арестова З.Я. Способ определения стресс-реактивности животных / Авторское свидетельство СССР №1716448. - М.Кл. G 01 N 33/53. - Бюл. 1992. - № 8.

Тираж 50 экз.

Відкрите акціонерне товариство «Патент»

Україна, 88000, м. Ужгород, вул. Гагаріна, 101

(03122) 3 - 72 - 69 (03122) 2 - 57 - 03