

ФЛЮОРЕСЦЕНТНАЯ МЕТОДИКА НЕИНВАЗИВНОГО ЭКСПРЕСС-КОНТРОЛЯ ЗА ПРИЁМОМ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

О.Д. Смирнова

Московский областной научно-исследовательский клинический институт
(МОНИКИ) им. М.Ф. Владимирского, Москва

Методами лазерной флюоресцентной диагностики можно быстро и неинвазивно контролировать приём фармацевтических препаратов пациентами. Для этого достаточно в заданной пропорции добавлять в лекарственный препарат флюоресцентную метку из разряда пищевых добавок, и контролировать флюоресценцию в выбранном участке тела пациента. По интенсивности флюоресценции можно определять дозировку получаемой метки, а значит, и основного лекарственного средства. Метод полезен для апробации новых схем медикаментозного лечения, поскольку позволяет контролировать самостоятельный приём пациентами назначаемых препаратов.

Ключевые слова: лазерная флюоресцентная диагностика, контроль фармпрепаратов, флюоресцентная метка, хлорофилл

В фармацевтике существует проблема контроля за своевременным и полным, в соответствии с предписанием, приёмом фармпрепаратов, а также их усвоением пациентами. Это актуально как для зарегистрированных лекарственных форм, так и для препаратов, находящихся на стадии клинических испытаний, конкретно для пероральных форм, применяемых пациентами самостоятельно. Страховые медицинские фонды заинтересованы в том, чтобы пациенты, находящиеся в оплачиваемом больничном отпуске, а также пациенты, получающие лекарственные препараты за счёт страховщиков, своевременно и в полном объеме принимали курс лечения. Также необходим контроль за пациентами, участвующими в клинических испытаниях. Не секрет, что социальные настроения в обществе далеко не в пользу доверия врачам. Зачастую пациенты полностью или частично игнорируют назначенные медицинские предписания [1]. Для оценки корреляции выбранного курса лечения с его результатами необходим контроль за регулярным и дозированным применением прописанных медикаментозных форм.

Стандартные способы выявления наличия препарата в организме пациента инвазивны, рутинны и связаны с дополнительными финансовыми затратами [2]. По нашему мнению, способна решить эту проблему быстро и достаточно простыми средствами современная лазерная неинвазивная флюоресцентная диагностика [3]. Для этого нами предложено смешивать в заданной пропорции основной исследуемый фармпрепарат с флюоресцентной меткой, входящей в список разрешённых пищевых добавок, например, с экстрактом хлорофилла. Хлорофилл обладает ярко выраженной флюоресценцией с длиной волны в максимуме излучения в районе 680 нм [4], что позволяет в любой момент терапии быстро и неинвазивно контролировать его уровень в организме по соответствующей флюоресценции кожи испытуемого.

Целью данного исследования было установление взаимосвязи между дозировкой перорального введения модельного фармпрепарата – аскорбиновой кислоты – и флюоресценцией сопутствующего пищевого экстракта хлорофилла в коже мышей. Задачей было получение

Таблица 1

Суточная дозировка хлорофилла и сопутствующего витамина С в опытных группах мышей и сроки приёма препаратов.

№ группы	Дозировка хлорофилла, мг/(кг веса·сут)	Дозировка аскорбиновой кислоты, мг/(кг веса·сут)	Длительность курса приёма, сут
1	0,3	3	30
	0	0	7
	0,6	5	30
2	4	4	30
	0	0	7
	7,2	7,2	30
3	6,3	3,1	30
	0	0	7
	8	4	30

модельной калибровочной кривой зависимости интенсивности флюоресценции от регулярной дозировки препарата.

Материал и методы

В исследовании использовалось 4 группы беспородных белых мышей, самцы, 6÷8 месяцев. Три группы принимали препарат аскорбиновой кислоты (витамин С), смешанный с экстрактом хлорофилла и добавляемый в питьевую воду, в разных дозировках в течение месяца. Затем, спустя 7 дней перерыва, каждую дозировку увеличили – и продлили приём ещё на месяц (табл. 1). Четвёртая группа – контрольная. Контроль за потреблением воды в группах вёлся в среднем по каждой группе и составлял на протяжении всего эксперимента 70÷100 мл/(кг веса·сутки).

В течение всего срока мышей регулярно диагностировали при помощи спектрального лазерного неинвазивного комплекса ЛАКК-М [5] – на предмет интенсивности флюоресценции хлорофилла в коже. Перед каждой процедурой исследуемые участки кожи (хвост мыши) мыли водой с нефлюоресцирующим ПАВ (“Прогресс”), затем протирали 96 %-ным этанолом. Измерение флюоресценции проводилось постановкой оптоволоконного лазерного зонда перпендикулярно поверхности хвоста в 1 см от его основания (рис. 1). Возбуждение флюоресценции осуществлялось лазерами 532 нм и 632 нм. Исследуемый флюоресцирующий препарат хлорофилл при этом давал сигнал в области 675 ± 5 нм.

Результаты и обсуждение

Наличие флюоресцентной метки хлорофилла регистрировалось в коже мышей уже через сутки после начала применения. На полученных спектрах хорошо видно увеличение сигнала хлорофилла при увеличении срока применения препарата (рис. 2).

В ходе проведения эксперимента было установлено, что уже в первые дни курса применения препаратов интенсивность флюоресценции метки в коже растёт и быстро выходит на «плато» постоянной концентрации при регулярном приёме, что наблюдалось в данном эксперименте уже на 5–7 сутки. Причём после



Рис. 1. Процесс регистрации флюоресценции с кожи хвоста мыши

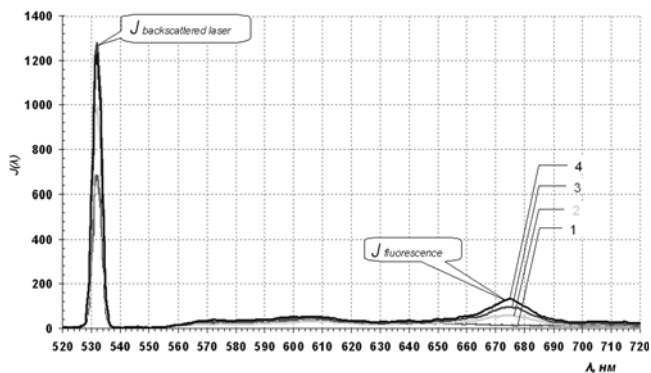


Рис. 2. Зависимость регистрируемого сигнала $J(\lambda)$ от срока приёма препарата при суточной дозе потребления 20 мг/(кг веса·сут). $J(\lambda)$ – регистрируемый сигнал, выраженный в условных единицах прибора, λ – длина волны: 1 – до начала приёма препарата; 2 – 1 сутки приёма препарата; 3 – 5 суток приёма препарата; 4 – месяц приёма препарата

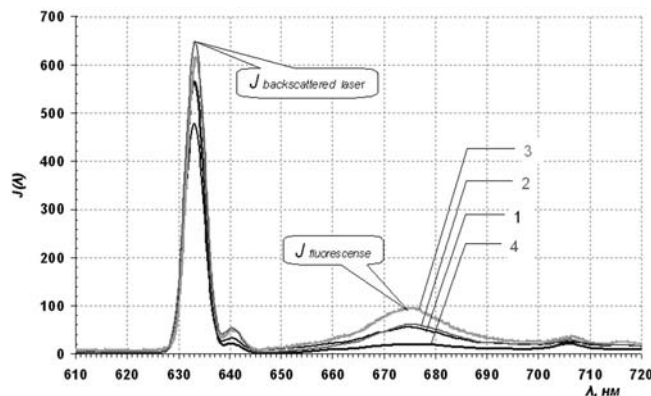


Рис. 3. Флюоресценция в разные сроки курса приёма препарата: 1 – 3 суток, 2 – 4 суток, 3 – 10 суток, 4 – 4 суток отмены препарата после курсового приёма

окончания курса приёма уже на 4 сутки было заметно исчезновение сигнала флюорофора (рис. 3). Интенсивность сигнала также хорошо коррелировала с принимаемой дозой флюорофора (рис. 4).

По полученным данным был построен калибровочный график (рис. 5), позволяющий оценить по интенсивности флюоресценции дозировку регулярно получаемой флюоресцентной метки. Для этого рассчитывался функционал $S_{J|t}$ среднеинтегрального относительного изменения флюоресценции на участке длин волн [650; 690] нанометров по формуле:

$$S_{J|t} = \frac{1}{690 - 650} \int_{650}^{690} \left(\frac{J_1(\lambda)}{J_0(\lambda)} - 1 \right) d\lambda, \quad (1)$$

где $J_0(\lambda)$ – спектр флюоресценции с контрольных участков хвоста *in vivo*, снимаемый изначально, до начала приёма препаратов, $J_1(\lambda)$ – спектр флюоресценции, снимаемый в контрольное время t тестирования принятой дозировки, λ – длина волны в нанометрах.

По этому графику, вычислив из спектральных данных функционал $S_{J|t}$, можно определить суточную дозировку потребляемой флюоресцентной метки в предположении ее ре-

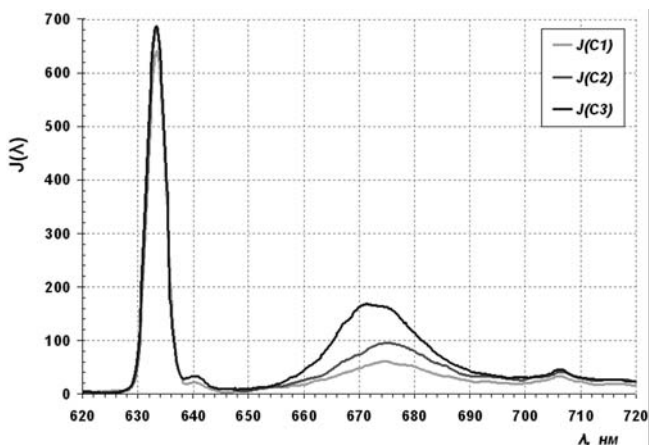


Рис. 4. Зависимость сигнала флюоресценции от дозировки хлорофилла на сроке 7 дней приёма препарата. $J(C1)$ – суточная дозировка флюорофора 0,6 мг/(кг веса·сут); $J(C2)$ – суточная дозировка флюорофора 4 мг/(кг веса·сут); $J(C3)$ – суточная дозировка флюорофора 8 мг/(кг веса·сут)

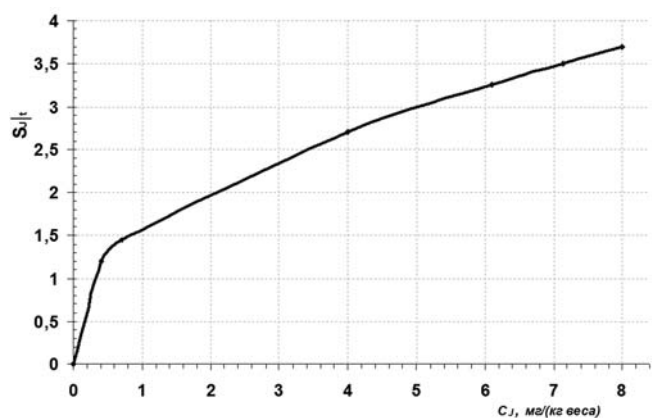


Рис. 5. Калибровочный график расчёта поглощённого количества флюоресцентной метки C_J

гулярного потребления – $C_J(S_J)$. Расчет суточной дозировки сопутствующего фармпрепарата C в миллиграммах на килограмм веса тела животного проводится по формуле:

$$c = C_J(S_J) \cdot \left(\frac{1}{\varphi} - 1\right) = C_J(S_J) \cdot \frac{X}{F} = C_J(S_J) \cdot \frac{1}{\frac{1}{\varphi} - 1}, \quad (2)$$

где φ – весовая доля флюоресцирующей добавки в исходной смеси. При этом расчёт φ осуществляется, исходя из соотношения суточных дозировок показанного фармпрепарата и используемой флюоресцентной метки:

$$\varphi = \frac{F}{F + X}, \quad (3)$$

где: X [мг/(кг веса·сутки)] – дозировка фармпрепарата, F [мг/(кг веса·сутки)] – дозировка флюоресцирующей метки для эффективной визуализации.

Таким образом, неинвазивный флюоресцентный экспресс-контроль за приёмом и усвоением фармпрепаратов вполне возможен и достаточно просто осуществим. Однако, стоит дополнительно заметить, что схема метаболизма для порфиринов у человека и грызунов несколько различна, поэтому необходим дополнительный комплекс исследований для оценки возможности построения аналогичных калибровочных графиков дозировки для человека. Кроме того, в каждом конкретном случае использования конкретной флюоресцентной метки для построения калибровочного графика необходимо проводить измерения флюоресценции в одном и том же участке тела испытуемого. Соответствующие измерения при наблюдении пациента также надо проводить на аналогичном участке кожи, с теми же параметрами по плотности, пигментации и микроциркуляции крови. Для таких целей, например, подходят тыльная сторона ладоней, мочка уха, заушная неволосистая область головы и т.п. При этом важно следить, чтобы диагностируемые участки были как можно менее пигментированными и не повреждёнными кожными патологиями [6].

Дополнительно, при использовании предшественников порфиринов или непосредственно порфириновых флюорофоров, в частности хлорофилла, для человека необходимо минимизировать потребление хлорофилл-содержащей пищи, т.к. её обилие (как и прекращение после длительного, регулярного приёма) приводит к искажению полезного сигнала [7]. Естественно, предварительно необходимо прове-

рить и отсутствие аллергических реакций пациента на сочетание форм основного препарата и пищевой добавки, используемой в качестве флюоресцентной метки.

Заключение

Проблема контроля за своевременным и дозированным приёмом фармпрепарата пациентами, видимо, может быть достаточно легко решена при помощи неинвазивной лазерной флюоресцентной диагностики, если основным фармпрепарат смешивать в постоянных заданных пропорциях с флюорофором, являющимся пищевой добавкой. Данный метод характеризуется быстротой и простотой осуществления, а также относительной дешевизной. Наличие такой обратной связи поможет делать адекватные выводы об эффективности назначенных методик лечения.

Список литературы

1. Силуянова И., Яковлев В. Врач глазами пациента. Соцпрос. // Медицинский вестник № 1–2 (470–471) 23 января 2009 г., С. 22–23.
2. Савчук С.А., Веденин А.Н., Изотов Б.Н. Обнаружение летучих токсичных веществ в биологических жидкостях организма методами газовой хроматографии и хромато-масс-спектрометрии. // Наркология, 2002, № 3, С. 37–45.
3. Рогаткин Д.А. Неинвазивная лазерная флюоресцентная диагностика в медицине. // Лазерная медицина, 2000, № 4(1), С. 30–35.
4. Saito Y. et al. Remote estimation of the chlorophyll concentration of living trees using laser-induced fluorescence imaging lidar. // Optical review, 2002, 9, No. 2, P. 3739.
5. Rogatkin D.A., Lapaeva L.G., Petritskaya E.N. et al. Multifunctional laser noninvasive spectroscopic system for medical diagnostics and some metrological provisions for that. // Proc. SPIE, 2009, 7368, 73681Y.
6. Smirnova O.D., Rogatkin D.A., Litvinova K.S. Collagen as In Vivo Quantitative Fluorescent Biomarkers of Abnormal Tissue Changes. // Journal of Innovative Optical Health Sciences (JIOHS), 2012, 5, issue 3 No. 2.
7. Lacowicz J.R. Protein Fluorescence. // Topics in Fluorescence Spectroscopy, 2002, 6, Kluwer Academic Publisher, New York.

**FLUORESCENT TECHNIQUE FOR NONINVASIVE EX TEMPORO MONITORING
OF ADMINISTRATION OF MEDICINES**

O.D. Smirnova

Moscow Regional Research and Clinical Institute "MONIKI" named after M.F.Vladimirskiy

Laser fluorescence techniques ensure quick and noninvasive control over drug intake by patients. Fluorescent marker that belongs to the group of food additives should be added to the drug in the given proportion. Fluorescence of the marker is then registered with the help of a laser spectral device in the chosen body area, in the skin, for example. In our work it has been shown that fluorescent marker dosage as well as the main drug substance can be determined according to the fluorescence intensity. It should be noted that irregularities in drug intake are reflected in the corresponding fluorescent spectra. The described method is useful for approbation of new schemes of drug treatment as it provides control over drug intake when patients use them independently after they were prescribed a medical specialist.

Keywords: Laser fluorescence diagnostics, control of medicines, fluorescent marker, chlorophyll

E-mail: smirnovaOksana@ya.ru