



УКРАЇНА

(19) UA (11) 35188 (13) U

(51) МПК (2006)

G01N 33/48

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ КОНТРОЛЮ ЗА ІНТЕНСИВНІСТЮ ТЮТЮНОПАЛІННЯ

1

2

(21) u200802621

(22) 28.02.2008

(24) 10.09.2008

(46) 10.09.2008, Бюл.№ 17, 2008 р.

(72) ГОРБАЧ ТЕТЯНА ВІКТОРІВНА, UA, БІЛЯЄВ
СЕРГІЙ ГЕОРГІЙОВИЧ, UA(73) ХАРКІВСЬКА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ ПІСЛЯ-
ДИПЛОМНОЇ ОСВІТИ (ХМАПО), UA(57) Спосіб контролю за інтенсивністю тютюнопа-
ління шляхом дослідження біологічної рідини і ви-
значення тіоціанідних іонів, який **відрізняється**
тим, що спочатку досліджують слину, яку фарбу-
ють хлорним залізом і при відсутності фарбування
або слабо-рожевому фарбуванні визначають від-

сутність паління, у тих, хто палить мало, або у тих,
хто палить періодично, виявляють червоне фар-
бування, у тих, хто палить часто, або у тих, хто
багато палить, - фіолетово-червоне фарбування,
після чого досліджують вміст тіоціанідних іонів в
сечі, який визначають за графіком, що будують на
підставі аналізу стандартних розчинів тіоціаніду
калію, при цьому вміст тіоціанату в сечі в межах
0,27-2,96 мг/л вважають фоновим (негативним)
результатом, тіоціанатурія в межах 3-4 мг/л - при-
граничний результат, значення більше 4,1 мг/л
вважають позитивним результатом, причому зна-
чення більше 7 мг/л - різко позитивним (у "злісних"
курців).

Корисна модель належить до медицини, а са-
ме до акушерства і може знайти застосування під
час досліджень антенатальної охорони плоду в
умовах паління подружньої пари.

Наукові дослідження в різних країнах, у тому
числі в Україні, показали, що тютюнопаління є
безпосередньою причиною розвитку багатьох за-
хворювань, патологій вагітності і пологів, що у свою
чергу, веде до підвищення рівня захворюваності і
смертності серед населення.

Впливу тютюнового диму піддаються не тільки
безпосередньо курці, але й особи, що працюють
(чи живуть) у приміщеннях, де палять. При цьому
пасивні курці, не вважаючи себе курцями, також
піддаються впливу шкідливих речовин тютюнового
димув. Серед останніх - нікотин, піридинові основи,
феноли, чадний газ, синильна кислота, канцеро-
генні речовини (бензпірен) і інші [Радбиль О.С.,
Комаров Ю.М. Курение. - М.: Медицина, 1988. -
С.20-24.].

Відомим є спосіб визначення тютюнопаління
шляхом анкетування. Однак у процесі проведення
наукових праць, присвячених зазначеній проблемі,
виникає необхідність в об'єктивному підтвердженні
тютюнопаління в обстежуваних людей, тому що, як
показали дослідження, результати опитувального
методу виявилися недостатньо точними [Беляев
С.Г. Способ объективной оценки уровня нагрузки
никотином у беременных женщин//Медико-

соціальні проблеми сім'ї. - 2006. - ТЛІ, N3. - С20-
12.].

Способи якісного визначення нікотину в біоло-
гічних рідинах дозволяють констатувати факт па-
ління тютюну, але не дають можливості визначити
кількість токсичних речовин, які потрапили до ор-
ганізму, що значно обмежує можливості дослідни-
ка. Виходом зі сформованої ситуації є кількісне
визначення нікотину і його метаболітів у біологіч-
них рідинах.

Для вивчення кількісного споживання тютюно-
вих виробів частіше використовують визначення
рівня карбоксигемоглобіну в крові, окисі вуглецю у
видихуваному повітрі, нікотину і продуктів його
метаболізму (котиніну) у сироватці крові і сечі
[Грачева К.М., Силантьева И.В., Шевелева Г.А.,
Шейна Н.И. Количественный анализ никотина в
плазме крови беременных и небеременных жи-
вотных методом газовой хроматографии //Гигиена
и санитария. - 1984. - N8. - С.60-62].

Основним недоліком визначення рівня карбок-
сигемоглобіну в крові є досить короткий період
напівперетворення цього сполучення (протягом
декількох годин) з одного боку, і відсутність спе-
цифічності з іншого. Дослідження з визначення
окису вуглецю у видихуваному повітрі показали
високу ефективність методу лише при палінні не-
задовго до дослідження (менш 1 години). У части-
ни випробуваних підвищена концентрація СО у
видихуваному повітрі через годину не виявляється-

(13) U

(11) 35188

(19) UA

ся, але чітко виявляється при обстеженні їх через 10 хвилин після паління. Більш того, виявлені істотні індивідуальні розходження концентрації СО у видихуваному повітрі [Клиорин А.И., Лазарь Г.Ю., Тверской А.А., Тиунов Л.А. Объективная проверка метода анонимного анкетирования, использованного в целях выявления курящих школьников //Педиатрия. - 1984. - N10. - С.70].

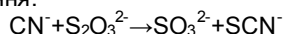
Як альтернативу зазначеним методикам використовують визначення нікотину в плазмі крові методом газової хроматографії. Відомо, що після однократного введення нікотин визначався в максимальній концентрації в плазмі крові вже через 2,5хв. Протягом наступних 2,5хв. вміст його знижувався приблизно в 2 рази. В інтервалі від 5 хвилин до 1 години з моменту введення концентрація нікотину в плазмі зберігалася відносно високою. Надалі відбувалося її подальше зменшення і через 1 добу нікотин знаходився в крові в мінімальних кількостях (у 25-30 разів менших, чим через 2,5 хвилини) [Дмитриев М.Т., Мишихин В.А. Газохроматографическое определение никотина в воздухе //Гигиена и санитария. - 1983. - N3. - С.53-55].

Звідси видно, що нікотин піддається в організмі досить швидкої трансформації, що обмежує застосування способу його визначення в часі. Крім того, метод газової хроматографії є досить громіздким, вимагає наявності відповідного устаткування і спеціально навченого персоналу.

Велика частина абсорбованого нікотину швидко розпадається в організмі, частково виводиться нирками; при цьому основним органом, що забезпечує детоксикацію є печінка, де відбувається перетворення нікотину в менш активний котинін. Після припинення паління котинін зберігається в сечі довше, ніж нікотин, і виявляється протягом 36 годин після вкурювання останньої сигарети [Радбиль О.С., Комаров Ю.М. Курение. - М.: Медицина, 1988. - С.20-24].

В даний час у процесі виконання наукових досліджень застосовують методику визначення котиніну в плазмі крові й у сечі методом газової хроматографії. Цей метод має велику точність і специфічність, однак не позбавлений ряду недоліків: необхідність використання спеціального дорогого устаткування, працювати на якому можуть тільки досвідчені, спеціально вивчений персонал; досить тривалий процес проведення самої методики, а також значна дорожня методу. Усе це серйозно обмежує можливості його використання для масових, скринінгових досліджень в умовах звичайних клінічних лабораторій установ охорони здоров'я.

У числі компонентів тютюнового диму вже згадувалися ціаніди (синильна кислота - HCN). У слині й в інших тканинах маєсся фермент роданаза, що знешкоджує ціаніди шляхом активації перетворення:



Як видно з рівняння реакції, продуктом знешкодження є тиоціаніди (роданіди). Тобто, роданіди слини (сечі, крові) є продуктами знешкодження ціанідів. Установлено, що в курців продукується велика кількість роданідів, тому що активація роданази - адаптивна реакція. З огляду на те, що

роданіди - стабільні метаболіти (період напіврозпаду близько 2 тижнів!), по їхньому рівню в біологічних рідинах можна визначити інтенсивність як активного, так і пасивного тютюнопаління [Шалаурова И.Ю., Серова Н.В., Филимонова Т.А., Николова И.К. Изучение уровня тиоцианата сыворотки крови как маркера курения среди мужчин г. Новосибирска //Современные проблемы диагностики и терапии заболеваний внутренних органов: сб. науч. трудов. - Новосибирск, 1985. - С.141-143.]. Цей спосіб обраний нами за прототип.

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалення способу контролю за інтенсивністю тютюнопаління, в якому за рахунок зміни досліджуваного матеріалу, досягається визначення кількості токсичних речовин, які потрапили до організму.

Поставлена задача вирішується в способі контролю за інтенсивністю тютюнопаління шляхом дослідження біологічної рідини і визначення тиоціанідних іонів, **згідно з корисною моделлю**, спочатку досліджують слину, яку фарбують хлорним залізом і при відсутності фарбування, або слабо-рожевому фарбуванні визначають відсутність паління, у мало, або у тих, хто палить періодично, виявляють червоне фарбування, у часто, або у тих, хто багато палить - фіолетово-червоне фарбування, після чого досліджують вміст тиоціанідних іонів в сечі, який визначають за графіком, що будують на підставі аналізу стандартних розчинів тиоціаніду калію, при цьому вміст тиоціанату в сечі в межах 0,27-2,96 мг/л вважають фоновим (негативним) результатом, тиоціанатурія в межах 3-4 мг/л - приграничний результат, значення більш 4,1 мг/л вважають позитивним результатом, причому значення більш 7 мг/л - різко позитивним (у «злісних» курців).

Роданіди слини виявляються по появі червоного фарбування при додаванні до слини хлорного заліза. Фарбування викликане утворенням комплексного з'єднання, що містить залізо і роданід. Ця реакція дуже чутлива.

Відомо, що в курців зі стажем часто є гінгівіти, парадентити, що супроводжується підвищенням ламкості і проникності капілярів і, як наслідок, появою домішки крові в слині. Цей фактор, у сполученні з вираженою в'язкістю слини курців, іноді унеможлиблює проведення експрес-тесту. У цих випадках, а також у разі потреби якісного визначення рівня роданідів (наприклад, при сумнівному результаті експрес тесту), виконують неавтоматизований спектрофотометричний аналіз вмісту тиоціанату в сечі.

Ми пропонуємо як критерій рівня навантаження в результаті тютюнопаління модифікований спосіб визначення тиоціанідних іонів у слині й у сечі, що володіє високою селективністю і чутливістю. При цьому він може бути проведений в умовах звичайної клінічної лабораторії, тому що не вимагає наявності спеціального дорогого устаткування, дорогих чи дефіцитних реактивів і може бути виконаний персоналом лабораторії. Відносна простота і невелика тривалість процесу постановки проб дозволяють використовувати пропонований спосіб в якості скринінгового методу при обстеженні великих груп людей.

Спосіб, що заявляється, здійснюють таким чином. Предметне скло поміщають на лист білого фільтрувального паперу. На скло послідовно наносять: 5 крапель слини, 2 краплі соляної кислоти і 2 краплі розчину хлорного заліза. Перемішують рідини тонкою скляною паличкою чи погойдуванням скла.

Оцінка тесту:

- у тих, хто не палить, відсутність фарбування (або слабо-рожеве фарбування за рахунок метаболічних роданідів);

- у мало чи у тих, хто періодично палить - червоне фарбування;

- у тих, хто часто, багато палить - фіолетово-червоне фарбування.

Реактиви.

1) Вихідний стандартний розчин тіоціаніду калію (0,167г. тіоціаніду калію розчиняють у 100мл. бідистильованої води).

2) Стандартні розчини тіоціаніду з концентрацією 2, 10, 20мг/л (готуються шляхом розведення вихідного розчину тіоціаніду калію).

3) Ацетатний буфер рН 4,1 (10,8р. $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ розчиняють у 24мол. крижаної оцтової кислоти, обсяг доводять до 1л. бідистильованої водою).

4) Реагент К (прозорий фільтрат суміші розчинів хлораміну-Т і хлористого заліза в співвідношенні 1:1):

- 1% розчин хлораміну-Т готують шляхом розчинення 1г речовини в 100мл. бідистильованої води;

- 0,1% розчин хлористого заліза наготовлюють шляхом розчинення 0,1г FeCl_2 у 100мл. бідистильованої води.

Реагент К можна використовувати через 12 годин після змішування розчинів. Термін збереження - 1міс. при температурі 0-4°C.

5) Реагент Р: 6г. барбітурової кислоти розчиняють у суміші, що складається з 30мл. γ-піколіну і 64мл. бідистильованої води з наступним додаванням 6мл. концентрованої соляної кислоти ($d=1,18$). Термін збереження - 1 місяць при температурі 0-4°C.

Попередня обробка проб.

У сухій пробірці зі скляною пробкою змішують 0,25мл. сечі і 1мл. ацетатного буфера, потім суміш доводять до обсягу 5мл. бідистильованою водою і добре перемішують.

Хід визначення. Вимір проводять у кюветах товщиною 1см. на спектрофотометрі. Стандартні і дослідні проби дивляться проти холостої.

Розрахунок.

Вміст тіоціанідних іонів визначають за графіком, що будують на підставі аналізу стандартних розчинів тіоціаніду калію. Калібрований графік бажано перевіряти для кожної серії аналізів.

Реагент	Холоста проба	Дослідна проба	Стандартна проба
Розведена проба		1мл.	
Розчин стандартних зразків			1мл.
Бідистильована вода	1мл.		
Реагент К	1мл.	1мл.	1мл.
Закривають пробірки, перемішують 20-30сек.			
Реагент Р	0,4	0,4	0,4
Перемішують, через 2-5хв. вимірюють оптичну щільність при $\lambda=605\text{nm}$.			

Вміст тіоціанату в сечі в межах 0,27-2,96мг/л вважають фоновим (негативним) результатом. Тіоціанатурія в межах 3-4мг/л - приграничний результат. Значення більш 4,1мг/л вважають позитивним результатом, причому значення більш 7мг/л - різко позитивним (у «злісних» курців).

У процесі проведення досліджень, що стосуються питань антенатальної охорони плоду в умовах тютюнопаління подружньої пари, способом анонімного анкетування нами було усього опитано

538 чоловік, з них зроблено 203 визначення тіоціанідних іонів по запропонованому нами способу. При цьому встановлено, що приблизно 67% опитаних ховають факт паління.

Таким чином, використання запропонованого способу визначення інтенсивності тютюнопаління дозволяє об'єктивно встановити наявність або відсутність паління, незалежно від бажання досліджуваного.