



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **46608** (13) **U**
(51) МПК (2009)
G01N 33/48МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ**ОПИС**
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту**(54) СПОСІБ ДОКЛІНІЧНОЇ ОЦІНКИ ІНТОКСИКАЦІЇ ОРГАНІЗМУ ВІД ВПЛИВУ КСЕНОБІОТИКІВ**

1

(21) u200907866

(22) 27.07.2009

(24) 25.12.2009

(46) 25.12.2009, Бюл.№ 24, 2009 р.

(72) СІРЕНКО ОЛЕНА ВІТАЛІЇВНА, ЖУКОВ ВІКТОР ІВАНОВИЧ, КУЧЕРЕНКО ЕЛА ОЛЕКСІЇВНА

(73) ХАРКІВСЬКА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ ПІСЛЯ-ДИПЛОМНОЇ ОСВІТИ

2

(57) Спосіб доклінічної оцінки інтоксикації організму від впливу ксенобіотиків, що здійснюють шляхом дослідження сироватки, який **відрізняється** тим, що проводять біохемілюмінесцентне і фосфоресцентне дослідження сироватки крові, метаболічну активність визначають по інтенсивності спалаху індукованої хемілюмінесценції та активації фосфоресценції в порівнянні з контрольними значеннями.

Корисна модель відноситься до експериментальної медицини, у тому числі, до патологічної фізіології, та може бути використана у клінічній фізіології, терапії, профілактичній медицині, токсикології, судовій медицині, лабораторних дослідженнях. Розробка діагностичних і прогностичних методів, що дозволяють оцінити стан організму, є однією з пріоритетних задач профілактичної медицини. Будь-яке порушення динамічної рівноваги внутрішнього середовища організму, викликане дією агресивних факторів або розвитком патологічних станів, призводить до зміни хімічного складу біологічних рідин. Дослідження показників сироватки крові є загальноприйнятим, але у науковій літературі майже не зустрічаються дані щодо її метаболічної активності. У той же час, сучасні лабораторні методи дослідження (біохімічні, імунологічні) дозволяють оцінити лише окремі характеристики структурних одиниць організму, тоді як високо динамічний зв'язок компонентів такого складного біокопюду як сироватка, віддзеркалює стан гомеостатичної функції організму взагалі.

Найбільш близьким та обраним за прототип є спосіб визначення впливу ксенобіотиків на організм, який здійснюють шляхом використання реакцій специфічного лізису, агломерації лейкоцитів (РСЛЛ, РСАЛ), реакції пошкодження базофілів (РСПБ) після постановки внутрішньо шкірних, на шкірних та кон'юнктивальних тестів з хімічними речовинами. Метод відноситься до клітинно-опосереднених тестів і заснований на змінах функції клітин крові під впливом ксенобіотика, що потрапляє у систему. (Алексеева О.Г. Иммунология профессиональных хронических бронхолегочных заболеваний / Москва: Медицина, 1987. - С.194-224с.).

Недоліком цього способу є його відносна специфічність при обстеженні контингентів, що контактують з різними хімічними алергенами, обумовлена наявністю індивідуальної імунологічної реактивності на одні й ті ж речовини. Крім того, існує можливість отримати позитивні результати при наявності у обстеженого гіперчутливості уповільненого типу у відповідь на велику кількість ксенобіотиків. Цим фактом обумовлено, що якщо відсоток позитивних реакцій РСАЛ, РСЛЛ та РСПБ у обстежених не перевищує 10%, реакцію на ксенобіотики вважають негативною.

Аналіз наукової літератури виявив, що інтегративні біофізичні методи дослідження метаболічних процесів в організмі контингенту, що зазнає дії агресивних хімічних чинників, майже не використовуються. У той же час, для сучасної практичної медицини актуальним є визначення ступеню напруженості адаптаційних гомеостатичних механізмів, що дозволяє оцінити вплив ксенобіотиків на здоров'я людини.

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалення способу доклінічної оцінки інтоксикації організму від впливу ксенобіотиків, в якому за рахунок зміни характеру дослідження, досягається можливість оцінити валив шкідливого чинника саме на ліпідні та білкові компоненти сироватки, швидко отримати дані щодо активації процесів вільнорадикального окиснення (ВРО) та перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), які потенціюють розвиток вільнорадикальної патології та порушують співвідношення анаболічних і катаболічних процесів в організмі.

Спосіб дозволяє провести оцінку метаболічної активності сироватки крові, як інтегративного показника гомеостатичної функції організму в умовах

(13) **U**(11) **46608**(19) **UA**

дії різноманітних шкідливих чинників або виникнення патології.

Поставлена задача вирішується в способі доклінічної оцінки інтоксикації організму від впливу ксенобіотиків, який здійснюють шляхом дослідження сироватки крові, згідно з корисною моделлю, проводять біохемілюмінесцентне та фосфоресцентне дослідження сироватки крові, її метаболічну активність визначають по інтенсивності спалаху індукованої БХЛ, кінетиці реакції та інтенсифікації фосфоресценції зразку сироватки в порівнянні з контрольними значеннями.

Відомо, що люмінесценцію називають процес, не пов'язаний з випромінюванням тепла, а заснований на спонтанному світінні біологічних об'єктів, обумовленому вільнорадикальним окисненням ліпідних і білкових компонентів тканин організму. До складу сироватки крові входять різні фракції білків, ліпідів, ферментів, мікроелементів, вміст кожного з котрих має значення для оцінки порушень гомеостатичної функції організму та діагностики донозологічних станів. Вплив ксенобіотиків здатний модулювати радіотоксичні ефекти, що призводять до змін метаболічної активності ліпопротеїдів сироватки. Реєстрація біохемілюмінесценції (БХЛ) та фосфоресценції (Ф) досліджуваного біологічного матеріалу є інтегративним способом, який дозволяє оцінити вплив шкідливого чинника саме на ліпідні та білкові компоненти сироватки, швидко отримати дані щодо активації процесів вільнорадикального окиснення (ВРО) та перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), які потенціюють розвиток вільнорадикальної патології та порушують співвідношення анаболічних і катаболічних процесів в організмі. Виконання дослідження займає мінімум часу, є простим, інформативним і може використовуватися на превентивних етапах діагностики великої кількості захворювань.

Показники хемілюмінесценції та фосфоресценції сироватки крові при навантаженні ксенобіотиками або патології відрізняються від нормальних вірогідно підвищеними значеннями. Інтенсивність спонтанного світіння відображає специфіку біохімічних процесів та взаємодії компонентів сироватки крові.

Спосіб виконують за допомогою люмінесцентного комплексу, який складається з фосфороскопу, ртутної лампи, що генерує світло оптичного діапазону та спектрофотометру (СФ-4). Визнача-

ють зміни метаболічної активності сироватки крові груп населення, що протягом тривалого часу контактують зі шкідливими речовинами: гальмівними та охолоджуючими рідинами (ГР та ОР). У групи працівників виробництва вищезазначених органічних сумішей вранці натще беруть кров з локтевої вени, отримують сироватку крові. Зразки готують шляхом нанесення на покривне скло сироватки, після чого препарат висушують протягом 30 хвилин при 24°C, поміщують у фосфороскоп та проводять дослідження. Використовують спектри збудження (λ - 297, 313, 334, 365, 404, 434) протягом 1млсек. Після збудження зразків біологічного матеріалу реєструють показники ФР. Контролем є зразки сироватки групи ІТР, які не контактують з органічними речовинами. Ступінь підвищення метаболічної активності сироватки визначають по інтенсивності світіння зразків на різних хвилях збудження. Інтенсифікація ФР виникає за рахунок наявності молекул білків та ліпопротеїдів у триплетному стані, які висвітлюють фотони енергії при падінні збудження у відсутності світла оптичного діапазону. Реєстрація ФР проводилася на вимірювальному обладнанні, основою якою є фосфороскоп, який забезпечує розділення у часі процесів опромінювання зразка збуджуючим світлом та його ФР з обов'язковим забезпеченням абсолютного світлозахисту фотоприймача від дифракції збуджуючого світла, чого можна досягнути, використовуючи люменометр, який забезпечує абсолютний світлозахист фотоелектронного множника.

Для вимірювання ФР зразків на кварцеву пластину розміром 15×15мм наносили 50мкл сироватки, які висушували при 30°C у термостаті протягом 20хв до виникнення твердої плівки. Пластина з висушеною сироваткою поміщували у фосфороскоп та виміряли її ФР. Джерелом збуджуючого світла була ртутна лампа ДРК-120 монохроматора ДМП-4, виділяли наступні лінії збудження: 297, 313, 334, 365, 404 і 434нм. Розмір вихідної щілини монохроматора складав 2мм, зона спектральної чутливості ФЕМ - 300-530нм. ФР реєстрували при кімнатній температурі у режимі підрахунку фотонів. Вимірювальним пристроєм був лічильник СБС-2, усі процеси вимірювань автоматизовані, погрішність складала менше 3%.

Таблиця 1

Динаміка фосфоресценції сироватки крові робітників виробництва

Спектри збудження (λ)	Контроль (ІТР)	Органічні суміші, М±m		
		ГР	ОР-65	ОР-40
297	4248,6±68,7	4327,6±61,1	4397,5±63,5*	4462,7±64,9*
313	3248,5±27,8	3612,8±42,5*	3579,9±31,6*	3704,6±33,2*
334	618,9±20,3	794,9±20,4*	786,8±19,7*	821,4±26,2*
365	1889,5±39,4	2064,3±33,1*	2115,7±25,3*	2124,6±29,4*
404	459,7±17,9	638,4±18,5*	609,4±18,3*	658,3±23,7*
434	609,6±14,8	815,2±20,1*	779,0±17,6*	836,8±16,3*

Примітка: різниця показників вірогідна, ($p < 0,05$).

Рівні фосфоресценції сироватки крові з підвищеною метаболічною активністю (білками та ліпопротеїдами у конформаційному стані) були вірогідно вище контрольних значень, що і є діагностичним критерієм.

Спосіб засновано на реєстрації спонтанної та індукованої (H_2O_2) БХЛ сироватки крові робітників, безпосередньо пов'язаних з виробництвом органічних сумішей і інженерно-технічної групи (ІТР). На основі змін співвідношення інтенсивності спалаху світіння та кінетики реакції оцінюють вираженість впливу ксенобіотиків на показники. Дослідження

БХЛ проводили на автоматичному хемілюмінометрі БХЛМЦ 10-1. Забір венозної крові проводили вранці натще, після чого отримували сироватку крові. Зразки біологічного матеріалу термостатували у темновій камері при $37^\circ C$, після чого виміряли власну інтенсивність світіння сироватки крові та індуковану 0,5% розчином перекису водню, реєструючи спалахи світіння та кінетику реакції протягом 1,5-3 хвилин. Встановлено, що інтенсивність спалаху індукованої ХЛ сироватки крові усіх професійних груп перевищувала контрольні показники у середньому на 250 імп/хв. (табл.2).

Таблиця 2

Динаміка індукованої БХЛ сироватки крові робітників виробництва органічних сумішей, (I^0 - імп/с), ($M \pm m$)

Професійні групи	Кількість обстежених (219)	Стаж роботи (років)			
		2-12	12-22	22-32	32 та більше
Контроль	23	748±33	963±47	869±36	902±20
Апаратники: перегонки	35	915±31*	1207±34*	1307±25*	1154±20*
- синтезу	34	959±34*	1259±18*	1379±34*	1135±36*
- окиснення	38	812±27	1184±37	1253±17*	1269±34*
- гідратації	34	724±35	1238±24*	1268±35*	1274±35*
Мастери:					
- електрики	15	563±23	969±22	957±33	863±16
- слюсарі	18	689±28	965±35	922±28	839±20
Лаборанти	22	546±21	908±23	835±22	876±22

Нотатка: різниця показників вірогідна, ($p < 0,05$).

Показники БХЛ у групах перевищували контрольні у середньому на 515-719 імп/с. Світіння сироватки крові робітників виробництва відзначалося крутою та високою амплітудою першого підйому ХЛ. Хемілюмінограми групи ІТР мали більш повільне та невиражене підвищення спалаху і наявність другої амплітуди. Виникнення другого спалаху обумовлене дією захисних механізмів організму при компенсованому навантаженні ксенобіотиками.

Неспецифічне підвищення метаболічної активності сироватки крові у відповідь на вплив хімічних факторів віддзеркалює недостатність компенсаторних адаптивних механізмів організму.

Таким чином, визначення метаболічної активності сироватки крові за допомогою інтегративних біофізичних методів є інформативним, простим у виконанні та точним способом, що може бути застосований під час обстеження великих контингентів людей, які контактують із шкідливими речовинами.