



УКРАЇНА

(19) UA (11) 81880 (13) C2
(51) МПК (2006)
G01N 33/49
G01N 33/48
A61B 5/145

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ РЕПЕРFUЗІЙНОГО УШКОДЖЕННЯ ІШЕМІЗОВАНОЇ НИЖНЬОЇ КІНЦІВКИ

1

2

(21) а200701551

(22) 14.02.2007

(24) 11.02.2008

(72) КАХАНОВСЬКИЙ ЕДУАРД ФЕЛІКСОВИЧ, UA,
САГАЧ ВАДІМ ФЕДОРОВИЧ, UA

(73) САГАЧ ВАДІМ ФЕДОРОВИЧ, UA,
КАХАНОВСЬКИЙ ЕДУАРД ФЕЛІКСОВИЧ, UA

(56) В.Ф. Сагач, Т.В. Шиманська, С.М. Надточій. Фактор, який вивільнюється під час реперфузії ішемізованого серця, може бути маркером відкриття мітохондріальної пори // Фізіол. журнал, 2003, т.49, № 4. В.Ф. Сагач, А.В. Дмитієва, Т.В. Шиманська, С.М. Надточій. Фактор, який вивільнюється під час реперфузії ішемізованого серця, дослідження впливу на міокард, коронарні та периферичні судини // Фізіол. журнал, 2002, т.48, № 1.

(57) 1. Спосіб оцінки реперфузійного ушкодження ішемізованої нижньої кінцівки, згідно з яким реєструють показник оксидативного стресу по забору досліджуваної крові, з урахуванням якого оцінюють реперфузійне ушкодження ішемізованої нижньої кінцівки, який **відрізняється** тим, що як показник оксидативного стресу реєструють

стабільний мітохондріальний фактор (СМФ), при цьому після забору досліджуваної крові одержують сироватку з випробуваної крові, здійснюють повне осадження білків сироватки, одержання надосадової рідини (супернатанту), спектрофотометричне дослідження отриманої надосадової рідини, реєстрацію даних в ультрафіолетовому спектрі, будують графік залежності оптичної щільності поглинання надосадової рідини від довжини хвилі, за яким оцінюють реперфузійне ушкодження ішемізованої нижньої кінцівки.

2. Спосіб за п.1, який **відрізняється** тим, що одержання сироватки з випробуваної крові здійснюють шляхом центрифугування.

3. Спосіб за п.1, який **відрізняється** тим, що одержання надосадової рідини (супернатанту) здійснюють шляхом центрифугування осадженої сироватки.

4. Спосіб за п.1, який **відрізняється** тим, що спектрофотометричне дослідження отриманої надосадової рідини і реєстрацію даних в ультрафіолетовому спектрі проводять у діапазоні хвиль 230-260 нм.

Винахід відноситься до медицини і стосується способів оцінки розвитку оксидативного стресу в ішемізованій нижній кінцівці.

Оксидативний стрес бере участь у розвитку багатьох патологічних процесів, включаючи реперфузійні порушення після ішемії. Він збільшує враження органів і, тим самим, погіршує загальний клінічний результат. Механізми оксидативного стресу в порушенні гемодинаміки нижніх кінцівок при ішемії - реперфузії до кінця не з'ясовані. Їхнє вивчення дозволить запобігти й полегшити плин захворювань із порушенням гемодинаміки нижніх кінцівок.

Результати досліджень в області біохімії і фізіології, накопичені за останні роки, вказують на ключову роль надмірної інтенсифікації вільнорадикальних окисних реакцій у реперфузійному ушкодженні тканин. Відновлення

адекватного кровотоку в ішемізованих регіонах може мати як захисний репаративний ефект, так і ефект, що ушкоджує. Причиною цього є активні форми кисню, які для тканин, що перебувають у гіпоксії - ішемії, є агентом, що ушкоджує. Збільшення активних форм кисню при синдромі реперфузії призводить до розвитку оксидативного стресу.

Встановлено, що оксидативний стрес блокує синтез білка і нуклеїнових кислот, пригнічує гліколіз і сприяє роз'єднанню окисного фосфорилювання, інгібує активність деяких ферментів (глюкозо-6-фосфатази, аденілатциклази), що викликає порушення функції багатьох тканин. На клітинному рівні основною ланкою цього процесу є відкриття мітохондріальних пор (МП). Донедавна дослідження збільшення проникності

(13) C2

(11) 81880

(19) UA

мітохондріальних мембран в умовах цілісного організму було неможливо.

Відомий найбільш близький за своєю суттю до пропонованого спосіб оцінки відкриття мітохондріальної пори, як показника розвитку оксидативного стресу [див. Brookes P.S., Darley-Usmar V.M. Role of calcium and superoxide dismutase in sensitizing mitochondria to peroxynitrite-induced permeability transition // *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol.* - 2004. - Vol. 286, №1. - p. H39-H46].

Цей спосіб дає змогу оцінити утворення МП за допомогою реєстрації набухання мітохондрій, які одержують з органів забитих тварин. Можливий тільки в умовах *in vitro*, вимагає великої кількості реактивів, крім того він довготривалий і потребує додаткового обладнання на проведення дослідження.

В основу винаходу покладено завдання такого вдосконалення способу розвитку оксидативного стресу в ішемізованій нижній кінцівці, при якому за рахунок визначення стабільного мітохондріального фактору (СМФ), що є маркером відкриття мітохондріальної пори в клітинах тканин, що гинуть, і визначення його в крові, що відтікає від нижньої кінцівки, що була у стані ішемії - реперфузії, забезпечується підвищення ефективності лікування з одночасним спрощенням процесу, зменшенням кількості реактивів і часу оцінки.

Для вирішення цього завдання у способі оцінки розвитку оксидативного стресу в ішемізованій нижній кінцівці, згідно з яким реєструють показник оксидативного стресу по забору досліджуваної крові, з урахуванням якого оцінюють розвиток оксидативного стресу в ішемізованій нижній кінцівці, згідно винаходу як показник оксидативного стресу реєструють стабільний мітохондріальний фактор (СМФ), при цьому після забору досліджуваної крові, одержують сироватку з випробуваної крові, повне осадження білків сироватки, одержання надосадової рідини (супернатанта), спектrophотометричне дослідження отриманої надосадової рідини, реєстрацію даних в ультрафіолетовому спектрі, будують графік залежності оптичної щільності поглинання надосадової рідини від довжини хвилі, за яким реєструють СМФ, оптимальним є, коли одержання сироватки з випробуваної крові здійснюють шляхом центрифугування, одержання надосадової рідини (супернатанта) здійснюють шляхом центрифугування осадженої сироватки, а спектrophотометричне дослідження отриманої надосадової рідини і реєстрацію даних в ультрафіолетовому спектрі проводять у діапазоні хвиль 230-260нм.

У результаті досліджень останніх років нами виявлений СМФ, що був зареєстрований спектrophотометрично в ультрафіолетовому спектрі, у діапазоні хвиль 230-260нм із максимумом 240-250нм, який вивільняється в кровоток при відкритті МП, і, внаслідок цього, може служити маркером оксидативних ушкоджень клітки, ініційованих відкриттям МП. Відкриття МП здійснюється під впливом вільних радикалів.

Більшість досліджень, у яких вивчалася роль СМФ як маркера відкриття МП, проведені *in vitro*.

Проведені нами клінічні дослідження показали, що методика реєстрації СМФ за допомогою спектrophотометрії в сироватці крові, що відтікає від реперфузованої нижньої кінцівки, корелює із розвитком оксидативного стресу в ушкодженій кінцівці. Запропонована методика може використовуватися в клінічній практиці для оцінки реперфузійного ушкодження ішемізованої нижньої кінцівки. Визначення СМФ може бути використане для діагностики розвитку реперфузійного синдрому, оцінки ефективності лікування та попередження розвитку реперфузійного синдрому при ішемії нижньої кінцівки.

Приклад конкретної реалізації способу оцінки розвитку оксидативного стресу в ішемізованій нижній кінцівці.

Хворий Г., історія хвороби №13086, був прооперований 20.06.2006 з приводу гострого артеріального тромбозу стегно-підколінного сегменту справа. Під час операції згідно запропонованого способу була набрана кров хворого до і після відновлення кровотоку у враженій кінцівці. Кров була підготовлена та було проведено дослідження. Методика одержання сироватки крові: відбиралася проба крові інтраопераційно, через 10 хв після реканалізації обтурированого артеріального сосуда із супровідної до артерії вени. Пробу крові центрифугували при 3000 об/хв протягом 10 хв. В отриману сироватку додавали 50% трихлороцтову кислоту з розрахунку 0,1 мол трихлороцтової кислоти на 1 мол сироватки для повного осадження білків. Розчин ретельно перемішували й залишали на 10 хв. Далі центрифугували при 3000 об/хв протягом 15 хв. Після цього збирали надосадову рідину і проводили спектrophотометричне дослідження останньої. Оптичну щільність поглинання розчинів вимірювали за допомогою спектrophотометра Specord 200M. Для виміру використовували кварцові 10-ти міліметрові кювети, що дозволяють працювати в області ультрафіолетового спектра. В одну кювету заливали контрольний розчин, а в іншу - досліджуваний зразок. Зразки містилися в спектrophотометрі, де проводилося вимірювання співвідношень між двома світловими потоками монохроматичного світла: тим, що пройшов крізь кювету з рідиною, і потоком, що падав на неї. Виміри проводилися в ультрафіолетовій ділянці спектра при довжині хвилі від 230 до 260нм. Функціональну залежність оптичної щільності поглинання від довжини хвилі будували за допомогою Microsoft Office Excel 2003.

Отриманні результати були представлені у вигляді графіка (додається), на якому представлена залежність оптичної щільності поглинання сироватки крові з ішемізованої кінцівки після реперфузії від довжини хвилі. Величину СМФ оцінювали за показником різниці між значенням його оптичної густини при $\lambda=245$ і 235нм.

Дослідження проводились неодноразово у хворих з гострою ішемією нижніх кінцівок.

Отримані результати дозволяють використовувати вказаний спосіб для діагностики реперфузійного синдрому при гострій ішемії нижніх кінцівок.

