



УКРАЇНА

(19) UA (11) 20305 (13) U
(51) МПК (2006)
A61B 10/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ СТАНУ СИМПАТО-АДРЕНАЛОВОЇ РЕГУЛЯЦІЇ ПРОЦЕСІВ АДАПТАЦІЇ У ВАГІТНИХ

1

2

(21) u200608381

(22) 26.07.2006

(24) 15.01.2007

(46) 15.01.2007, Бюл. № 1, 2007 р.

(72) Калугіна Людмила Вадимівна, Вдовиченко
Юрій Петрович(73) Калугіна Людмила Вадимівна, Вдовиченко
Юрій Петрович(57) Спосіб оцінки стану симпато-адреналової ре-
гуляції процесів адаптації у вагітних шляхом гісто-
хімічного визначення катехоламінів у еритроциті,

який відрізняється тим, що виконують цифрові копії оптичного зображення фрагментів мазків, потім проводять мікроденситометричну оцінку цитоплазми кожного еритроцита всієї площі мазка за показником "середня яскравість", після чого отримані результати обробляють статистично, розраховують кількість еритроцитів, необхідних для отримання достовірних даних, і при зниженні показників до 155,4 одиниць яскравості прогнозують виснаження симпато-адреналової системи.

Корисна модель відноситься до медицини, зокрема до акушерства та гематології, і може бути застосований для оцінки стану симпато-адреналової регуляції процесів адаптації.

Відомо, що катехоламіни (КА) абсорбуються на еритроцитах шляхом рецепторного ендцитозу та потрапляють у цитоплазму клітин, де зв'язуються з гемоглобіном, що перешкоджає їх окисленню у кров'яному руслі. Кількісні показники вмісту катехоламінів в еритроцитах, здійснення ними ролі з депонування та транспорту вказаних гормонів до ефекторних органів залежить від багатьох факторів. Існує декілька методів визначення вмісту катехоламінів у крові: газорідинна хроматографія, люмінесцентна гістохімія, радіоферментний, імуноферментний та флюорометричний аналіз. Перераховані методики є працюєми, потребують виснаження симпато-адреналової системи (12). Найбільш близьким до нашої пропозиції (12) рішення є цитохімічний метод виявлення катехоламінів у еритроцитах. Зміст методу складається з окислення катехоламінів біхроматом калію та забарвлення утворених адренохромів азотнокислим сріблом, яке при цьому відновлюється у металічне та виявляється у цитоплазмі еритроцитів у вигляді темних включень різної форми [3].

Недоліком вказаного способу є те, що візуальна оцінка включень у протоплазмі еритроцита зводиться до підрахунку їх кількості у кожній клітині у вигляді п'яти градацій (1 - відсутність забарвлених включень; 2 - виявлення від одного до трьох вклю-

чень - брилок, пухирців або темного обідку у цитоплазмі; 3 - наявність 4-6 брилок, пухирця, або великої брилки чи пухирця; наявність 4-6 великих брилок чи пухирців; 5 - наявність скупчень брилок та пухирців у вигляді різних фігур, або поява темних клітин). Підрахунок здійснюється у декількох полях зору (500-1000 еритроцитів) та визначають відсоток вмісту еритроцитів у кожній групі, після чого перераховують кількість КА на один еритроцит. Вказаний підрахунок є суб'єктивним, так як різні дослідники можуть мати власне уявлення про форму та розміри включень у еритроцитах. Оцінка кількості включень у такій великій кількості еритроцитів роблять процес оцінки працюєми, можуть привести до дублювання клітин, що у цілому вносить значні помилки та створює невірне уявлення про вміст катехоламінів за різної патології.

В основу корисної моделі поставлена задача вдосконалення методу кількісної оцінки вмісту КА у кожному пересічному еритроциті шляхом гістохімічного визначення за допомогою комп'ютерної мікроденситометрії.

Поставлена задача вирішується тим, що, згідно корисної моделі, отримують цифрові копії оптичного зображення фрагментів мазків, потім проводять мікроденситометричну оцінку цитоплазми кожного еритроцита всієї площі мазка за показником "середня яскравість", після чого отримані результати обробляють статистично, розраховують кількість еритроцитів, необхідних для отримання достовірних даних, і при зниженні показників до 155,4 о.я. в одиницях яркості прогнозують висна-

(13) U
(11) 20305
(19) UA

ження симпато-адреналової системи.

Спосіб виконується слідує чиним. Об'єктом дослідження є мазки крові, приготовлені за методикою Г.І. Мордарь, Д.П. Кладієнко для гістохімічного визначення катехоламінів у еритроцитах. Спочатку отримують цифрові копії оптичного зображення фрагментів мазків (фотокамера Olympus C740UZ; мікроскоп ЛЮМАМ-8Р, об'єктив 60^x - водна імерсія, окуляр 10^x). Мікроденситометрію проводять шляхом аналізу цифрових копій зображення за допомогою ліцензійної комп'ютерної програми „GIMP”, версія 1.2.3 (Spenser Kimball, Peter Muttis - free were). Концентрацію КА визначають на підставі замірів цитоплазми кожного еритроцита всієї площі мазка за показником „середня яскравість” (в одиницях яскравості). Отримані результати обробляються статистично, що клітин). Підрахунок здійснюється у декількох полях зору (500-1000 еритроцитів) та визначають відсоток вмісту еритроцитів у кожній групі, після чого перераховують кількість КА на один еритроцит. Вказаний підрахунок є суб'єктивним, так як різні дослідники можуть мати власне уявлення про форму та розміри включень у еритроцитах. Оцінка кількості включень у такій великій кількості еритроцитів роблять процес оцінки працеміським, можуть привести до дублювання клітин, що у цілому вносить значні помилки та створює невірне уявлення про вміст катехоламінів за різної патології.

В основу корисної моделі поставлена задача вдосконалення методу кількісної оцінки вмісту КА у кожному пересічному еритроциті шляхом гістохімічного визначення за допомогою комп'ютерної мікроденситометрії.

Поставлена задача вирішується тим, що, згідно корисної моделі, отримують цифрові копії оптичного зображення фрагментів мазків, потім проводять мікроденситометричну оцінку цитоплазми кожного еритроцита всієї площі мазка за показником „середня яскравість”, після чого отримані результати обробляють статистично, розраховують кількість еритроцитів, необхідних для отримання достовірних даних, і при зниженні показників до 155,4 о.я. прогнозують виснаження симпато-адреналової системи.

Спосіб виконується слідує чиним. Об'єктом дослідження є мазки крові, приготовлені за методикою Г.І. Мордарь, Д.П. Кладієнко для гістохімічного визначення катехоламінів у еритроцитах. Спочатку отримують цифрові копії оптичного зображення фрагментів мазків (фотокамера Olympus C740UZ; мікроскоп ЛЮМАМ-8Р, об'єктив 60^x - вод-

на імерсія, окуляр 10^x). Мікроденситометрію проводять шляхом аналізу цифрових копій зображення за допомогою ліцензійної комп'ютерної програми „GIMP”, версія 1.2.3 (Spenser Kimball, Peter Muttis - free were). Концентрацію КА визначають на підставі замірів цитоплазми кожного еритроцита всієї площі мазка за показником „середня яскравість” (в одиницях яскравості). Отримані результати обробляються статистично, що надає можливість розрахунку необхідної кількості еритроцитів для отримання достовірних результатів.

Результати клінічних досліджень

Проілюструвати дану методику дослідження може порівняння концентрації КА у вагітних з анемією та поєднаною патологією. Для виконання поставленого завдання нами було обстежено 43 вагітних жінки (18-34 тижні гестації), з них з анемією на тлі захворювань нирок запального генезу - 21, з анемією вагітних - 13 та 9 - з фізіологічним перебігом вагітності. Середній вік склав 22,7±1,28 років. Більшість обстежених 32 (74,42%) були першовагітними. Контрольна група - 19 здорових жінок аналогічного віку.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою ліцензійної програми BioStat 4.03, результати вважали вірогідними при P<0,05.

Мікроденситометричний аналіз показав, що концентрація КА у еритроцитах жінок контрольної групи є значно вищою ніж у жінок з анемією вагітних та осіб з поєднаною патологією.

На фіг.1 відображені показники концентрації катехоламінів у еритроцитах жінок, де: 1 - жінки репродуктивного віку; 2 - здорові вагітні; 3 - вагітні з анемією; 4 - вагітні з анемією та хронічним пієлонефритом. Достовірність різниці з показниками контролю та фізіологічним перебігом вагітності склала - p<0,01*.

За представлених даних на фіг. 1. можна зробити заключення, про те, що вірогідна різниця концентрації КА в еритроцитах існує не тільки з контролем, а й за порівняння груп вагітних з анемією та поєднаною патологією, також спостерігається вірогідна різниця (p<0,05).

Таким чином, можна стверджувати, що анемія вагітних на тлі захворювань нирок запального генезу сприяє зниженню депонування КА еритроцитами та зменшенню транспорту вказаних гормонів до органів та тканин.

Для підтвердження окремих положень про зв'язок між рівнем КА та концентрацією гемоглобіну вивчено стан периферичної крові, результати представлені у табл. 1.

Таблиця 1

Показники	Контроль n=13	Вагітні з анемією та пієлонефритом n=13	Вагітні з анемією n=13
Еритроцити (на 10 ¹²)	4,37±0,058	3,89±0,094**	3,86±0,132**
Гемоглобін (г/л)	132,6±3,05	102,5±2,07**	99,09±3,706**
Гематокрит (%)	36,4±0,48	32,83±0,78**	31,8±1,02**
СОК (мкм ³)	83,43±0,109	81,64±0,238**	81,42±0,441**
Кольоровий показник	0,92±0,013	0,796±0,018**	0,78±0,020**
СВГ в одному еритроциті (пг)	27,15±0,079	24,28±0,269**	24,4±0,61**

Абсолютне насичення еритроцитів Нв	33,57±0,163	31,95±0,264**	31,82±0,463**
Діаметр еритроцита (мкм)	7,16±0,029	6,87±0,021**	6,86±0,049**
Тромбоцити (10 ⁹)	252,9±6,88	275,9±10,29	253,3±9,021
Лейкоцити (10 ⁹)	6,48±0,295	9,57±0,599*	5,47±0,304**◇
Паличкоядерні (%)	2,17±0,297	4,36±1,485	2,36±0,636
Сегментоядерні(%)	61,33±1,416	63,09±2,630	58,18±3,033
Лімфоцити (%)	32,75± 1,702	26,82±1,958*	35,45±2,971◇
Моноцити (%)	1,75±0,218	2,0±0,43	1,82±0,182
ШОЕ (мм/год)	7,27±1,181	14,18±1,892**	12,55±2,225*

Примітки:

* $p < 0,05$ достовірність різниці з показниками контролю,

** $p < 0,01$ достовірність різниці з показниками контролю,

◇ $p < 0,05$ достовірність різниці між показниками дослідних груп.

Дані таблиці свідчать про вірогідну різницю показників червоної крові у жінок дослідних груп з показниками контролю. У вагітних з анемією між-групова різниця відмічена лише у кількості лейкоцитів та лімфоцитів.

Для встановлення взаємозв'язку між вмістом КА у еритроцитах та кількісних показників периферичної крові у жінок контрольної групи використані коефіцієнти рангової кореляції Спірмена. Виявлений кореляційний зв'язок високого ступеню між вмістом КА та гемоглобіном - $r = 0,885$ ($p < 0,001$), кольоровим показником - $r = 0,808$ ($p = 0,002$); середнього ступеню - з СВГ (середнім вмістом гемоглобіну) у еритроциті - $r = 0,542$ ($p < 0,05$) та з діаметром еритроцитів - $r = 0,649$ ($p = 0,02$). В той же час, у дослідних групах кореляційні зв'язки між вказаними показниками втрачаються.

Враховуючи вплив КА на систему глутатіону, проведений регресійний аналіз між показниками концентрації гормонів та відновленням глутатіоном у осіб обстежених груп. На фіг.2 представлена лінійна регресія і кореляція між КА (х) та відновленням глутатіоном (у) у здорових осіб. Коефіцієнти регресії: $\beta = 0,0066$; $\alpha = 0,28$; $r = 0,5$; $P = 0,007$.

Таким чином, можна чітко прослідкувати причинно-наслідкові відношення між даними показниками у нормі, в той час як за наявності у вагітних жінок анемії та поєднання цієї патології з хронічним пієлонефритом даний зв'язок втрачається.

Отримані дані свідчать, що між станом симпато-адреналової системи та показниками червоної крові, системою глутатіону у жінок з анемією вагітних на тлі хронічного пієлонефриту порушуються функціональні взаємозв'язки, це, безумовно, впливає на перебіг вагітності та стан плоду.

Технічним результатом даної корисної моделі є:

1. Вперше застосовано комп'ютерну мікро-денситометрію для оцінки вмісту КА у еритроциті;

2. Вказана методика шляхом уніфікації показника „середня яскравість“, що визначається, дозволяє кількісну оцінку концентрації КА у еритро-

циті;

3. Застосування кількісного показника „середня яскравість“ надає можливість розрахунку необхідної кількості еритроцитів для отримання достовірних результатів та зменшити кількість дослідних клітин до десятків;

4. Технічні можливості комп'ютерного аналізу виключають можливість повторної оцінки однієї й той же самої клітини, завдяки можливості редагувати цифрове зображення;

5. Використання комп'ютерної мікро-денситометрії повністю виключає з аналізу суб'єктивний фактор;

6. Кількісна оцінка концентрації КА у еритроциті дозволяє проведення кореляційного та регресійного аналізу з метою виявлення причинно-наслідкового зв'язку з іншими факторами;

7. Комп'ютерна мікро-денситометрія є точним та доступним методом визначення концентрації катехоламінів у еритроцитах та може бути використана для оцінки адренергічної регуляції процесів адаптації у вагітних з анемією на тлі хронічного пієлонефриту.

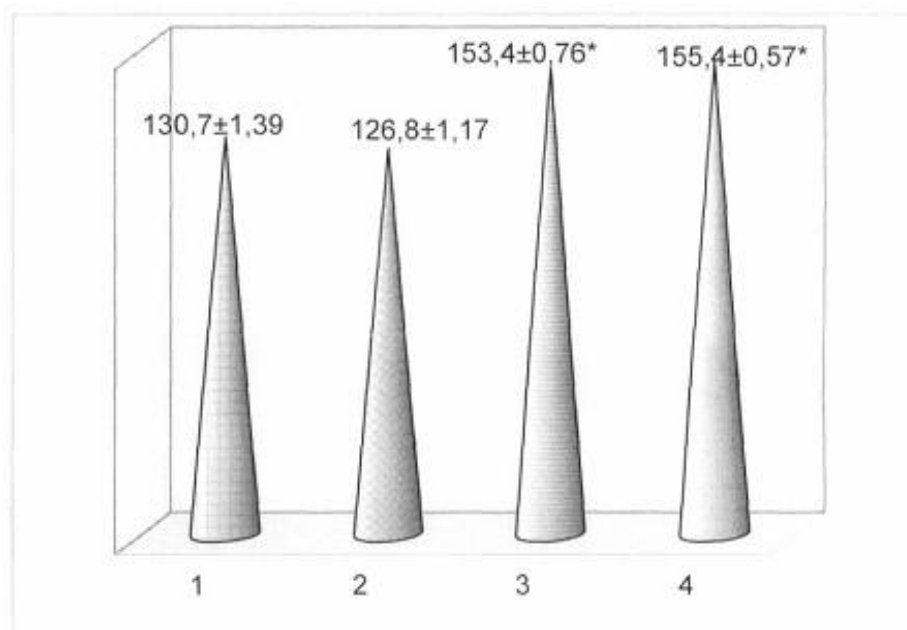
В порівнянні з прототипом запропонований спосіб оцінки стану симпато-адреналової регуляції процесів адаптації у вагітних підвищує вірогідність і точність методу, що дозволить своєчасно визначити адекватну тактику лікування.

Література:

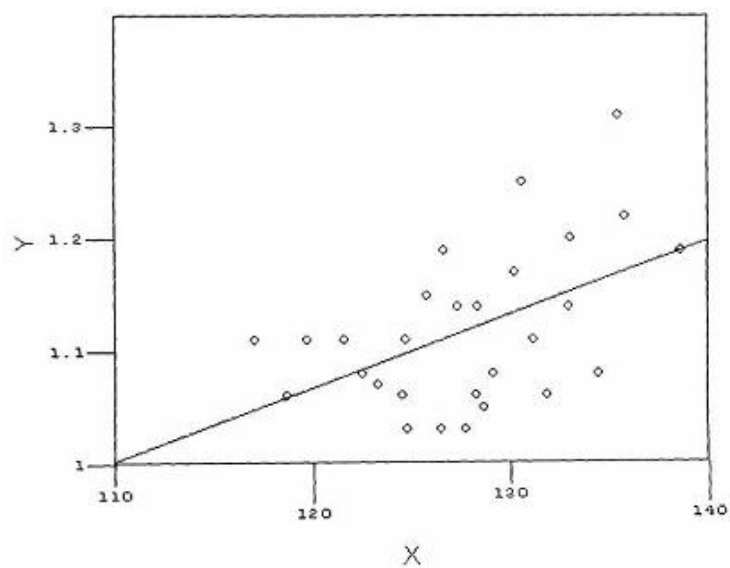
1. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Катехоламини: биохимия, фармакология, физиология, клиника // Вопр. мед. химии. - 2002.- Т. 48, №1.- С.45-67.

2. Еритроцит при захворюваннях внутрішніх органів: патогенетична роль морфофункціональних змін, діагностичне та прогностичне значення, шляхи корекції. / За ред. проф. М.Ю. Коломойця. - Чернівці, 1998. - С. 6-108.

3. Мардарь А.И., Кладиенко Д.П. Цитохимический метод определения катехоламинов в эритроцитах // Лаб. дело. - 1986. - №10. - С. 586-588.



Фиг. 1



Фиг. 2