



УКРАЇНА

(19) UA (11) 57175 (13) U
(51) МПК (2011.01)
G01N 33/48МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ МІТОХОНДРІАЛЬНО-ЗАЛЕЖНИХ РЕАКЦІЙ ОКИСЛЮВАЛЬНОГО ГОМЕОСТАЗУ ПРИ ПОШКОДЖЕННЯХ ЛИЦЕВОГО ЧЕРЕПА

1

2

(21) u201009772

(22) 05.08.2010

(24) 10.02.2011

(46) 10.02.2011, Бюл. № 3, 2011 р.

(72) ГРИГОРОВ СЕРГІЙ МИКОЛАЙОВИЧ

(73) ХАРКІВСЬКА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ ПІСЛЯ-ДИПЛОМНОЇ ОСВІТИ

(57) 1. Спосіб діагностики мітохондріально-залежних реакцій окислювального гомеостазу при пошкодженнях лицевого черепа, що включає вимір рівня вмісту у плазмі крові первинних та вторинних продуктів окисної модифікації ліпідних, білкових компонентів мембран клітин та визначення вмісту ферментів антиоксидантного захисту в спонтанних і індукованих реакціях з діагностикою реакції функціональної компенсації, метаболічного дисбалансу чи метаболічної декомпенсації, який **відрізняється** тим, що попередньо у лімфоцитах периферичної крові пацієнтів визначають вміст лактатдегідрогенази та рівень загального карнітину у сироватці крові до початку лікування та повторно через 2-3 доби, і коли показник гістохімічної активності лактатдегідрогенази лімфоцитів пере-

вищує, а загального карнітину менше попереднього рівня, роблять висновок про мітохондріально-енергодефіцитний варіант реакції окислювального гомеостазу у пацієнта з травматичним пошкодженням лицевого черепа, і навпаки.

2. Спосіб діагностики мітохондріально-залежних реакцій окислювального гомеостазу при пошкодженнях лицевого черепа за п. 1, який **відрізняється** тим, що у лімфоцитах периферичної крові замість лактатдегідрогенази визначають гістохімічну активність сукцинатдегідрогенази.

3. Спосіб діагностики мітохондріально-залежних реакцій окислювального гомеостазу при пошкодженнях лицевого черепа за п. 1, який **відрізняється** тим, що у лімфоцитах периферичної крові замість лактатдегідрогенази визначають гістохімічну активність глутаматдегідрогенази.

4. Спосіб діагностики мітохондріально-залежних реакцій окислювального гомеостазу при пошкодженнях лицевого черепа за п. 1, який **відрізняється** тим, що у лімфоцитах периферичної крові замість лактатдегідрогенази визначають гістохімічну активність гліцерофосфатдегідрогенази.

Корисна модель відноситься до медицини і може застосовуватися в технологіях клініко-лабораторного моніторингу, зокрема в клініці хірургічної стоматології та щелепно-лицевої хірургії для індивідуалізації комплексного лікування пацієнтів і профілактики ускладненого перебігу пошкоджень лицевого черепа.

Пошкодження лицевого черепа (ПЛЧ) - травма, наслідок якої, поряд з травмою м'яких тканин, має місце перелом лицевого черепа (ЛЧ), насамперед верхньої, нижньої щелепи чи інших кісток [Вернадский Ю.И. Травматология и восстановительная хирургия черепно-челюстно-лицевой области. - 3-е изд., перераб. и доп. - М.: Медицина, 2006. - 456 с.]. Унаслідок впливу травматичного фактора та біомеханічних особливостей травми ПЛЧ, як правило, супроводжується різного ступеня виразністю струсом головного мозку [Сайко Д.Ю. Диференційна діагностика, прогноз і лікування

постраждалих із струсом та ударом головного мозку легкого ступеня у гострому періоді черепно-мозкової травми: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. - Харків, 2007-21с.] та порушенням інтегративної його функції щодо забезпечення фізіологічних реакцій, зокрема реакцій біоенергетичного обміну та окислювального гомеостазу. Саме тому, диференційна діагностика мітохондріально-залежних реакцій окислювального гомеостазу при ПЛЧ є тактично значимою процедурою при добір лікування та його індивідуалізації у цієї категорії пацієнтів.

Як відомо, виникнення та розвиток ускладненого перебігу пошкоджень лицевого черепа визначається функціональним станом контактно-захисних систем організму пацієнта, системними рефлекторно-судинними реакціями, якістю та своєчасністю спеціалізованої медичної допомоги і проявляється запальними змінами у щелепно-лицевій ділянці, а також порушенням репаратив-

(13) U

(11) 57175

(19) UA

них процесів [Михайлова Л.Н. Репаративная регенерация костной и хрящевой ткани в условиях воздействия различных биомеханических факторов: автореферат диссертации на соискание учёной степени доктора мед. наук / Л.Н. Михайлова; Институт эволюционной морфологии и экологии животных им. А.Н. Северцова.-М., 1988.- 29 с; Астахова В.С. Иммунологические аспекты современной стоматологии и челюстно-лицевой хирургии / В.С. Астахова, В.А.Маланчук, О.Л.Серенкова // Сб. тез. Рес-публ. конф. «Современная стоматология и челюстно-лицевая хирургия».-Киев, 1998.-С.9-10].

При запальному процесі зростають енерготрати організму, особливо на тлі системної прозапальної відповіді, що і слугує чинником порушень клітинного енергообміну (мітохондріальної зумовленості порушень), які складають морфологічний субстрат формування ускладненого перебігу запального процесу [Зеленько О.А. Вплив комбінованої дії стрес-факторів на перебіг адаптаційних реакцій організму // Фізіол. журнал. - 2002. - Т. 48, №2. - С.97-98.], насамперед за рахунок гіпоксії тканин та порушень окислювального фосфорилування та зниження активності мітохондріальної транспортної системи [Коган В.С., Орлов О.Н., Прилипко Л.Л. Проблема анализа эндогенных продуктов перекисного окисления липидов. - М.: Медицина, 1986. - 287с]. Окрім того, в патогенезі ускладненого перебігу пошкоджень лицевого черепа, як і при інших запальних процесах, діагностично цінним та прогностично значимим є активація цитокинового каскада, пошкодження ендотеліоцитів, гіпоксія тканин, «мікроциркуляторно-мітохондріальний дистрес-синдром».

Відомий спосіб діагностики мітохондріально-залежних розладів біоенергетики клітин, який включає урахування стану енергетичного обміну на рівні ферментативного аеробного та анаеробного ланцюгів мітохондріальної біоенергетики. При цьому, активність аеробних мітохондріальних ферментів: сукцинатдегідрогенази (СДГ), глутаматдегідрогенази (ГДГ) та анаеробних мітохондріальних ферментів α -глицерофосфатдегідрогенази (α -ГФДГ) та позамітохондріальної лактатдегідрогенази (ЛДГ) визначають у лімфоцитах периферичної крові, застосовуючи кількісний цитохімічний метод Пірса у модифікації Р.П. Нарцисова (1986) і Э.И. Обозной (1989) у реакції с нітрофіолетовим тетразолієм з наступною візуалізацією та морфометрією [Чевари С, Андеял Т., Штрэнгер Я. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение // Лабораторное дело. - 1991. - №10. - С.9-13]. Спосіб базується на здатності п-нітротетразоліа фіолетового в процесі ферментативної реакції утворювати водонерозчинні гранули формаза, кількість яких підраховують у кожній з клітин. Цитохімічні реакції виконують на мазках крові, а фіксацію препарату проводять 60,0% розчином ацетону, попередньо насиченому дінатрієвою сіллю етилендіамінтетраоцетної кислоти (ЕДТА) за визначених стандартних умов цитохімічної фіксації мазків; для визначення активності фермента в популяції лімфоцитів - підраховують кількість гранул формаза в 30 клітинах за умов мікроскопії мазків при збільшенні їх у 400 разів з подаль-

шим перерахунком рівня ферментів в гранулах на клітину (гр/кл).

Зростання ферментативної активності супроводжується збільшенням у лімфоцитах кількості гранул формаза; водночас, утворення в лімфоцитах поліморфних, великих агрегатів формаза, свідчить про пошкодження мітохондрій, насамперед - мітохондріальних мембран.

Недоліками цього способу є не урахування загальної реакції окислювального гомеостазу у взаємозв'язку з типом мітохондріального енергодефіциту клітин, що знижує точність діагностики, особливо на ранніх стадіях формування запального процесу, зокрема - у пацієнтів з пошкодженням лицевого черепа.

Відомий також спосіб оцінки мітохондріальної біоенергетики шляхом визначення рівня вмісту загального карнітину сироватки крові ензиматичним методом [Коган В.С., Орлов О.Н., Прилипко Л.Л. Проблема анализа эндогенных продуктов перекисного окисления липидов. - М.: Медицина, 1986. - 287с]. Спосіб базується на здатності вільного карнітину ацилізуватися при взаємодії з ацетил-КоА у присутності карнітил-ацетилтрансферази; коenzим А, що утворюється в результаті реакції, взаємодіючи з 5,5'-дитиобис-2-тетробензойною кислотою, утворює забарвлений продукт, а кількість цього продукту пропорційно вмісту вільного карнітину; визначається спектрофотометрично при $\lambda=412\text{nm}$, а отриманий результат перераховується в мкмоль/л сироватки крові.

Недоліком цього способу, також, є неурахування загальної реакції окислювального гомеостазу у взаємозв'язку з типом мітохондріального енергодефіциту клітин, що знижує точність діагностики, що є значимим для пацієнтів з пошкодженням лицевого черепа, особливо на ранніх стадіях формування запального процесу.

Відомий спосіб діагностики реакцій окислювального гомеостазу за показниками окисної модифікації білків, нуклеїнових кислот та рівнями вмісту первинних і вторинних продуктів перекисного окислення ліпідів мембран клітин [Шкляр С.П., Фролова Т.В., Черкашина Л.В. Діагностика адаптаційних реакцій системи антиоксидантного захисту // Методичні рекомендації МОЗ України.-Київ, 2007.-20 с; Черкашина Л.В. Мета-аналіз функціонального стану окислювального гомеостазу під впливом антиоксидантої терапії хворих з системними дерматозами // Медицина 1...-2008.-№3.-С.45-50]. Цей спосіб дозволяє диференціювати наявність у пацієнта однієї із реакцій окислювального гомеостазу: функціональної компенсації, дисбалансу чи метаболічної компенсації. Для його здійснення виконують біохімічне дослідження периферичної крові пацієнта, визначаючи стан ферментативного ланцюга окислювального гомеостазу за вмістом супероксиддесмутази, глутатіонпероксидази, каталази у еритроцитах та а-токоферолу ацетату у сироватці крові. Окрім того, визначають вміст продуктів перекисного окислення ліпідів: малонового діальдегіду та дієнових кон'югатів і вміст NO-залежних метаболітів в плазмі, а також вміст білкових компонентів у сироватці крові 2,4 - динітрофенілгідрозонів та альдегідних і

карбонільних продуктів окисної модифікації білків у спонтанних та індукованих біохімічних реакціях. Після чого, застосовуючи спеціальний табличний алгоритм, виконують диференційну діагностику реакцій окислювального гомеостазу.

Недоліком цього способу є його громіздкість та ресурсозатратність, а також недоврахування типу мітохондріального енергодефіциту клітин, що знижує точність діагностики та збільшує терміни її виконання.

Цей спосіб є найбільш близьким по технічній суті та результату, що може бути досягнуто, тому його обрано за найближчий аналог.

В основу корисної моделі покладено задачу удосконалення способу оцінки реакцій окислювального гомеостазу у пацієнтів з пошкодженнями лицевого черепа, в якому за рахунок урахування цитохімічної активності індикативних мітохондріальних ферментів у лейкоцитах периферичної крові та біохімічних маркерів енергодефіцитності окислювального гомеостазу у сироватці крові, досягається зменшення ресурсозатратності та підвищення точності діагностики.

Задача, яку покладено в основу корисної моделі, вирішується тим, що у відомому способі оцінки реакцій окислювального гомеостазу, що включає вимір рівня вмісту у плазмі крові первинних та вторинних продуктів окисної модифікації ліпідних, білкових компонентів мембран клітин та визначення вмісту ферментів антиоксидантного захисту в спонтанних і індукованих реакціях з діагностикою реакції функціональної компенсації, метаболічного дисбалансу чи метаболічної декомпенсації, згідно з корисною моделлю, попередньо у лімфоцитах периферичної крові пацієнтів визначають вміст лактатдегідрогенази та рівень загального карнітину у сироватці крові до початку лікування та повторно через 2-3 доби, і коли показник гістохімічної активності лактатдегідрогенази лімфоцитів перевищує, а загального карнітину менше попереднього рівня, роблять висновок про мітохондріально - енергодефіцитний варіант реакції окислювального гомеостазу у пацієнта з травматичним пошкодженням лицевого черепа, і навпаки.

Можливо також у лімфоцитах периферичної крові замість лактатдегідрогенази визначати гістохімічну активність сукцинатдегідрогенази.

Також у лімфоцитах периферичної крові замість лактатдегідрогенази визначають гістохімічну активність гліцерофосфатдегідрогенази.

У лімфоцитах периферичної крові замість лактатдегідрогенази визначають гістохімічну активність гліцерофосфатдегідрогенази.

Зменшенням ресурсозатратності та підвищення точності діагностики мітохондріально-залежних реакцій окислювального гомеостазу при ПЛЧ досягають тим, що для процедури діагностики застосовують найбільш інформативні показники, що дозволяє у більш короткі терміни визначати енергодефіцитні варіанти реакцій окислювального

гомеостазу та, відповідним чином, індивідуалізувати лікувальну тактику.

Спосіб виконують наступним чином. В умовах спеціалізованого стаціонару для пацієнтів з ПЛЧ із плечової вени забирають необхідну кількість крові для проведення біохімічного та гістохімічного її дослідження, після чого у лімфоцитах визначають вміст лактатдегідрогенази, а у плазмі крові - рівень вмісту загального карнітину, і коли показник гістохімічної активності лактатдегідрогенази перевищує, а загального карнітину менше референтного рівня, роблять висновок про мітохондріально - енерго дефіцитний варіант реакції окислювального гомеостазу у пацієнта з травматичним пошкодженням лицевого черепа, і навпаки. При цьому, у разі відсутності референтної бази по цим показникам, за референтні приймають значення, отримані при первинному клініко-біохімічному обстеженні пацієнта, а визначення гістохімічної активності лактатдегідрогенази лімфоцитів та вміст загального карнітину виконують на момент звернення пацієнта та на етапах його хірургічного лікування. Це дозволяє забезпечувати клініко-біохімічний моніторинг стану пацієнта з ПЛЧ.

Приклад, який ілюструє спосіб. Пацієнт Юрій К., 37 років, звернувся 26.05.2010 р. в зв'язку з травмою лицевого черепа, зокрема наявності травматичного перелому нижньої щелепи в ділянці суглобового відростка нижньої щелепи справа та ментального отвору зліва, що отриманий напередодні. З метою діагностики мітохондріально-залежних реакцій окислювального гомеостазу, пацієнту виконано біохімічне дослідження щодо визначення рівня вмісту загального карнітину у сироватці крові (становить 36,5мкмоль/л) та гістохімічне дослідження змісту лактатдегідрогенази у лейкоцитах (становить 8,4 гр/кл). Після надання медичної допомоги (хірургічне втручання по репозиції кісток черепа та комплексного лікування згідно до клінічного протоколу), 30.05.2010 р. повторно виконано біохімічне дослідження щодо визначення рівня вмісту загального карнітину у сироватці крові (становить 22,8мкмоль/л) та гістохімічне дослідження вмісту лактатдегідрогенази у лейкоцитах (становить 12,3гр/кл). Оскільки на етапах лікування пацієнта рівень вмісту карнітину зменшився (з 36,5 до 22,8мкмоль/л), а вміст лактатдегідрогенази у лейкоцитах зріс (з 8,4 до 12,3гр/кл) то, згідно з корисною моделлю, можна зробити висновок про наявність у пацієнта з ПЛЧ мітохондріально-енергодефіцитного варіанту реакції окислювального гомеостазу, що сформувалась впродовж перших трьох діб з моменту травми.

Таким чином, запропонований спосіб діагностики мітохондріально-залежних реакцій окислювального гомеостазу при пошкодженнях лицевого черепа дозволяє у більш короткі терміни визначати енергодефіцитні варіанти реакцій окислювального гомеостазу та, відповідним чином, індивідуалізувати лікувальну тактику.

