



УКРАЇНА

(19) UA (11) 61220 (13) U
(51) МПК
G01N 33/49 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ЕНДОГЕННІЙ ІНТОКСИКАЦІЇ

1

(21) u201015934

(22) 29.12.2010

(24) 11.07.2011

(46) 11.07.2011, Бюл.№ 13, 2011 р.

(72) ЗОЛОТАРЬОВА ТЕТЯНА АНАНІЇВНА, ПАВЛОВА ОЛЕНА СЕМЕНІВНА, НАСІБУЛЛІН БОРИС АБДУЛАЄВИЧ, ОЛЕШКО ОЛЕКСІЙ ЯКОВЛЕВИЧ, РОДОМАКІН МИХАЙЛО В'ЯЧЕСЛАВОВИЧ, ЗМІЄВСЬКИЙ АНАТОЛІЙ ВАЛЕРІЙОВИЧ

2

(73) УКРАЇНСЬКИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ІНСТИТУТ МЕДИЧНОЇ РЕАБІЛІТАЦІЇ ТА КУРОРТОЛОГІЇ

(57) Спосіб оцінки визначення ендогенної інтоксикації шляхом вимірювання в сироватці крові вмісту молекул середньої маси (MSM_{254}), який **відрізняється** тим, що одночасно проводять визначення функціонального стану систем детоксикації: активність АОС крові, фагоцитарної активності нейтрофілів периферійної крові та інтенсивність фільтраційної здатності нирок.

Корисна модель належить до експериментальної медицини, а саме, для діагностики прояв ендогенної інтоксикації (EI).

EI - це неспецифічний синдром, який супроводжує ряд патологічних процесів внаслідок накопичення у концентраціях значно більших за фізіологічні токсичних продуктів метаболізму на тлі зсувів з боку функціонального стану систем детоксикації.

Найбільш важкі прояви EI виявлені у хворих із тяжкими станами (сепсис, опіки, травми, інфекційні хвороби тощо). Але, в останній час, доведено, що прояви EI визначаються і при хронічних станах (захворювання суглобів, артеріальна гіпертензія, хронічний психо-емоційний стрес тощо). Наявність EI значно посилює патологічний процес, що потребує застосування інформативних методів діагностики.

Існує декілька засобів лабораторної діагностики EI. Відомий спосіб діагностики EI [1] заснований на властивості еритроцитів периферійної крові абсорбувати продукти метаболізму, що накопичуються в крові хворих. Засіб виконують шляхом додавання до 1 мл еритроцитарної маси зразка крові, що досліджується, розчину вітального барвника і після процедури інкубації та центрифугування визначають оптичну щільність розчину.

За думкою авторів абсорбційна здатність еритроцитів нарастає залежно від важкості перебігу процесу. Так, найбільший відсоток поглинання барвника було виявлено у щурів з моделлю калового перитоніту ($64,1 \pm 5,0\%$ при нормі $45,2 \pm 5,1\%$, $p < 0,05$), тоді як у щурів з моделлю інфаркту міокарду цей показник складав усього $44,1 \pm 5,8\%$ та не відрізнявся від норми ($p > 0,5$).

Разом з тим цей метод має ряд суттєвих недоліків:

1. Метод інформативний тільки при його використанні в умовах тяжких прояв EI та невідповідний для встановлення прояв EI в умовах хронічних процесів;

2. Метод відображає тільки інтенсивність накопичення токсичних продуктів і не відображає стан систем детоксикації (АОС, імунологічні показники, фільтраційна здатність нирок).

Існує спосіб [2] діагностики ендогенної інтоксикації. Для виявлення наявності EI досліджують сироватку та плазму крові методом клиновидної дегідратації і при наявності у мазку під мікроскопом особливих структур, як то - штрихованість, паралельні, концентричні багатопроменеві та інші риси які можуть бути у вигляді чорної сітки, у вигляді риб'ячих лусочок тощо. Спосіб рекомендова-

(19) UA (11) 61220 (13) U

ний для діагностики EI, її етіології та ступеня токсичного процесу. Разом з тим, метод має ряд суттєвих недоліків:

1. Критерії оцінки, які пропонують автори носять дуже суб'єктивний характер;
2. Дані мікроскопії залежать від того яке поле знаходиться під окуляром мікроскопу і яке дослідник бачить у полі зору мікроскопу;
3. Відсутність кількісних критеріїв ознак EI;
4. Не відомо, як розраховують бали, у яких представлені результати;
5. Спосіб не відображає стан систем детоксикації.

Найбільш близьким до заявленого способу є метод визначення молекул середньої маси у сироватці крові тварин [3].

В основі даного способу діагностики EI лежить визначення в сироватці крові тварин (модель експериментальної ахолії) комплексу показників: вмісту MCM, креатиніну, білірубину та кількості лейкоцитів периферійної крові. Визначення MCM проводили наступним чином: сироватку крові обробляли 10% розчином ТХО (співвідношення компонентів 1:0,5), суміш центрифугували при 3000 об/хв., до 0,5 мл надосадової рідини додавали 4,5 мл дистильованої води та проводили вимірювання оптичної щільності при довжини хвилі 254 нм.

Недоліки метода:

1. Метод розроблений для виявлення ознак EI в умовах моделі гострого стану (ахолія - виведення жовчі) для якого характерна наявність запального процесу, про що свідчить суттєве підвищення кількості лейкоцитів периферійної крові;

2. Не досліджуються системи детоксикації, які суттєво впливають на розвиток EI.

В основу корисної моделі поставлено завдання удосконалення способу визначення EI шляхом вимірювання в сироватці крові тварин вмісту молекул середньої маси (MCM254) та визначення функціонального стану систем детоксикації, що дозволить значно спростити та удосконалити визначення EI.

Поставлене завдання вирішується тим, що у способі визначення EI шляхом вимірювання в сироватці крові тварин вмісту (MCM254), згідно до корисної моделі, одночасно проводиться визначення функціонального стану систем детоксикації: активність АОС крові, фагоцитарної активності нейтрофілів периферійної крові та інтенсивність фільтраційної здатності нирок.

Сутність способу діагностики полягає у наступному, у сироватці крові визначають вміст MCM. MCM - це універсальний показник, який вміщує продукти метаболізму, що накопичуються в організмі в концентраціях, що перевищують фізіологічні та проявляють токсичну дію на різні тканини та органи, що супроводжуються їх дисфункцією (блокада рецепторів природних пептидних стимуляторів, модифікація клітинних мембран тощо). Наслідком цього впливу з'являється порушення процесів мікроциркуляції, пригнічення синтезу білку, потенціювання процесів тромбоутворення.

Поширенню цих процесів в значній мірі сприяє стан систем детоксикації. Це, у першу чергу, системи АОС, захисні механізми імунної системи, повноцінність метаболічної функції печінки та фільтраційної функції нирок. Таким чином дуже важливим являється створення способу діагностики, який відображає стан цих компонентів патологічного процесу, який обумовлює формування EI та її наслідків.

На відміну від існуючих засобів, даний спосіб виявлення прояв EI включає визначення як інтенсивності накопичення в організмі MCM, так і визначення функціонального стану систем детоксикації.

Спосіб діагностики прояв EI проводиться по комплексу наступних показників: вміст MCM, активність АОС, фагоцитарні процеси, фільтраційна функція нирок.

Спосіб діагностики прояв EI здійснюють таким чином. У сироватці крові визначають вміст MCM спектрофотометрично при довжини хвилі 254 нм після осадження високомолекулярних білків розчином ТХО та центрифугування.

Активність антиоксидантної системи - по визначенню активності супероксиддисмутази (СОД), по здатності еритроцитів відновлювати нітросиній тетразолій супероксидазними радикалами (нітроформалін).

Фагоцитарну активність нейтрофілів периферійної крові визначають шляхом виявлення здатності нейтрофілів периферійної крові поглинати чужорідні частки (дріжджі). Результати виражають: кількістю активних нейтрофілів крові, їх метаболічної функції (НСТ-тест). Фільтраційну здібність нирок оцінювали за показниками швидкості клубенькової фільтрації, яка розраховується за даними креатинінового кліренсу.

Ефективність способу оцінки проявів EI ілюструються наступними прикладами.

Приклад 1

Відтворюють модель хронічного емоційно-імобілізаційного стресу у щурів шляхом утримання тварин у окремих клітинах, що обмежують їх рух протягом 3-х годин щодня протягом 30 діб. Верифікацію моделі здійснювали по наявності інволюційних процесів тіміко-лімфатичної системи, гіперфункції наднирникових залоз, деструктивних процесів в органах тощо.

На 15-ту добу експерименту у щурів проводили визначення показників, що діагностуються при проявах EI. Як це наведено у таблиці 1 (показники EI у щурів в умовах моделі емоційно-імобілізаційного стресу (EIC) на 15-ту добу відтворення моделі хронічного стресу ознаки EI не виявлено. Середні величини MCM, активність АОС, кількість активних фагоцитів, клубенькова фільтрація нирок знаходяться у межах норми. Виявлено лише зниження метаболічної активності фагоцитів периферійної крові, що доведено суттєвим зниженням показників НСТ-тесту.

Таблиця 1

Показники	Інтактні щури (контроль)	Модель хронічного стресу (15-та доба)		Модель хронічного стресу (30-та доба)	
	($M_1 \pm m_1$)	($M_2 \pm m_2$)	P	($M_3 \pm m_3$)	P
MCM ₂₅₄ , ум.од.	0,34±0,02	0,34±0,01	-	0,35±0,01	>0,5
АОС (СОД), %	46,4±1,08	44,53±0,52	>0,5	43,77±1,34	>0,5
Фагоцитоз, число активних фагоцитів, %	39,9±0,5	38,16±0,35	<0,05	37,6±0,4	<0,05
НСТ-тест, мг/мл: спонтанний	0,039±0,001	0,032±0,001	<0,01	0,035±0,001	<0,05
стимульований	0,090±0,002	0,071±0,002	<0,01	0,070±0,001	<0,01
Клубенькова фільтрація мл/(см ² ·хв)	0,10±0,02	0,10±0,001	-	0,10±0,001	-

Примітка, p - розраховано між показниками дослідних та контрольних щурів

Приклад 2

Відтворення моделі емоційно-імобілізаційного стресу за наступною методикою. Імобілізація тварин у окремих клітинах доповнювала дію стресогенних факторів: зміна часу їжі та освітлення (модель ЕІСС).

Як це наведено у таблиці 2 показники ЕІ у щурів в умовах моделі емоційно-імобілізаційного стресу посиленого ситуаційними факторами (ЕІСС) в умовах даної моделі виявляються значні прояви ЕІ, виявлені шляхом використання запропонованого метода діагностики ЕІ.

На 15-ту добу моделювання суттєво підвищуються показники МСМ, на тлі значно обмеженого функціонального стану показників систем детоксикації (суттєво знижена активність фагоцитозу та клубенькової фільтрації нирок).

На 30-ту добу моделювання зберігається обмеження фагоцитарного процесу (суттєве зниження кількості активних фагоцитів та величини НСТ-тесту), що свідчить про обмеження функціональної активності однієї із важливих ланок систем детоксикації. Залишається зниженою фільтраційна властивість нирок. На 30-ту добу спостережень ще більш обмежується активність АОС та інших показників систем детоксикації.

Таблиця 2

Показники	Інтактні щури (контроль)	Модель хронічного стресу (15-та доба)		Модель хронічного стресу (30-та доба)	
	($M_1 \pm m_1$)	($M_2 \pm m_2$)	P	($M_3 \pm m_3$)	p
MCM ₂₅₄ , ум.од.	0,34±0,02	0,57±0,01	<0,05	0,59±0,02	<0,05
АОС (СОД), %	46,4±1,08	42,17±1,14	>0,05	40,16±1,22	<0,05
Фагоцитоз, число активних фагоцитів, %	39,9±0,5	37,0±0,6	<0,05	37,2±0,4	<0,05
НСТ-тест, мг/мл: спонтанний	0,039±0,001	0,030±0,001	<0,01	0,030±0,001	<0,01
стимульований	0,090±0,002	0,065±0,001	<0,01	0,063±0,001	<0,01
Клубенькова фільтрація мл/(см ² ·хв)	0,12±0,01	0,07±0,001	<0,01	0,07±0,001	<0,001

Примітка, p - розраховано між показниками дослідних та контрольних щурів

Таким чином, корисна модель виявляє ознаки ЕІ в умовах експерименту та має ряд переваг перед існуючими:

1. Відображає стан всіх основних патогенетичних компонентів ЕІ (інтенсивність інтоксикації та функціональний стан систем детоксикації);
2. Виявляє ознаки ЕІ в умовах відтворення хронічних процесів;
3. Відображає інтенсивність прояв ЕІ, що значно підвищує інформативність методу діагностики ЕІ.

Література:

1. Тогайбаев А.А. Способ диагностики эндотоксемии / А.А. Тогайбаев, А.В. Кургузкин, И.В. Рикун, Р.М. Карибжанова // Лабораторное дело. - 1988. - №9. - с. 22-24.
2. Патент RU 2378991, МПК А61В 10/00, G01N 1/28.
3. Попов А.Н. Эндотоксемия при экспериментальной ахолии / А.Н. Попов, М.М. Минненбаев // БЭБ и М. - 1997. - Т. 1. - с. 101-102 - ближайший аналог.

