



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 62342

(13) A

(51) 7 G01N33/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ  
НА ВИНАХІДвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ РОЗВИТКУ ПОРУШЕНЬ ФУНКЦІОНУВАННЯ ВНУТРІШНІХ ОРГАНІВ ПРИ ГІПЕРТЕНЗІЇ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

1

2

(21) 2003032054

(22) 07 03 2003

(24) 15 12 2003

(46) 15 12 2003, Бюл. № 12, 2003 р

(72) Самохіна Любов Михайлівна, Бондар Тетяна  
Миколаївна, Зубов Павло Михайлович, Ломако  
Вікторія Вікторівна(73) ІНСТИТУТ ТЕРАПІЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ  
НАУК УКРАЇНИ

(57) Спосіб оцінки розвитку порушень функціонування внутрішніх органів при гіпертензії в експерименті, який полягає у тому, що досліджують біологічні зразки, проводять оцінку одного з двох контрольних показників вмісту оксиду азоту у щурів, за зміною вмісту контрольних показників свідчать про виникнення дисфункції нирок при гіпертензії внаслідок впливу стресу, який відрізняється тим, що як біологічні зразки використовують гомогенати тканин легень, серця та нирок, додатково як контрольний показник визначають вміст основ Шифа в нейтральних і фосфоліпідах, при підвищенні вмісту обох контрольних показників у серці свідчать про локальні патогенетичні зміни під впливом психоемоційного стресу, при підвищенні вмісту оксиду азоту та основ Шифа в нейтральних ліпідах у нирках свідчать про локальні патогенетичні зміни під сумісним впливом психоемоційного та токсичного стресу, при підвищенні лише вмісту основ Шифа в фосфоліпідах легень свідчать про патогенетичні зміни у легенях під впливом токсичного стресу

Винахід відноситься до біохімії, і може бути використаний в експериментальній медицині для оцінки супутнього ураження легень, серця, нирок за умов гіпертензії під впливом психоемоційних і/або токсичних факторів

Відомий спосіб оцінки психологічного стресу як фактору ризику гіпертензії (див. Hemodynamic and autonomic adjustments to real life stress conditions in humans / D. Lucini, G. Norbiato, M. Clerici, M. Pagani // Hypertension - 2002 - V 39, N1 - P 184-188), який включає оцінку рівня стресу за вмістом кортизолу у слині людини. Свідчать про зростання кардіоваскулярного ризику при гіпертензії за умов збільшення рівня кортизолу у слині

Недоліком відомого рішення є обмеження області застосування лише оцінкою впливу емоційного стресу та ризику виникнення серцево-судинних порушень при гіпертензії, не передбачено прогнозування патогенезу внутрішніх органів, таких як легені, нирки

Відомий спосіб оцінки ендогенної інтоксикації (див. Метод діагностики ендогенної інтоксикації / Т.Г. Фецих, Ю.Й. Михайлович, М.Ф. Тімочко // Деклар. Пат. України №19649 А від 25 12 97 Бюл. №6), який полягає у тому, що досліджують кров людини. Визначають активність ферменту супероксиддисмутази та рівень перекисного окиснення

ліпідів, розраховують коефіцієнт балансу про- та антиоксидантних процесів

Недоліком відомого способу є призначення лише для оцінки токсичного впливу на організм, крім того не передбачено прогнозування виникнення патогенезу окремих внутрішніх органів

Відомий спосіб оцінки ендотеліальної дисфункції при гіпертензії (див. Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L et al Endothelial dysfunction in hypertension // J Cardiovasc Pharmacol - 2001 - V 38, Suppl 2 - P S11-14), який включає дослідження вмісту оксиду азоту в крові і нирках щурів, за зниженням рівня NO свідчать про дисфункцію ендотелію периферичного і коронарного макро- і мікроциркуляторного русла та нирок та розвиток серцево-судинних порушень при гіпертензії

Недоліками відомого способу є неспецифічність оціночних маркерів, тому, що, по-перше, проводять оцінку виникнення серцево-судинних порушень за дослідженням крові та нирок, а не серця експериментальних тварин, по-друге, оцінюють зниження рівня NO, яке не обов'язково є патогенетичним

Відомий також спосіб оцінки судинної і гломерулярної дисфункції нирок при гіпертензії (США) (див. Trollet M R, Rudd M A, Loscaizo J Oxidative stress and renal dysfunction in salt-sensitive

(13) A

(11) 62342

(19) UA

hypertension // Kidney Blood Press Res - 2001 - V 24, N2 - P 116-123) - прототип, який полягає у тому, що досліджують сечу щурів. У якості контрольних показників оцінюють вміст оксиду азоту і циклічного гуанозинмонофосфату. За зниженням рівня контрольних показників свідчать про розвиток окислювального стресу та, як наслідок, виникнення судинної і гломерулярної дисфункції нирок при гіпертензії.

Недоліком відомого рішення є обмеження області застосування лише для оцінки виникнення дисфункції нирок при гіпертензії, без урахування змін в інших внутрішніх органах.

В основу винаходу поставлена задача розробки такого способу оцінки розвитку порушень функціонування внутрішніх органів при гіпертензії в експерименті, у якому вибір більш специфічних та інформативних біохімічних показників та біологічного матеріалу забезпечить можливість оцінки розвитку порушень функціонування легень, серця, нирок при гіпертензії за умов емоційного та/або токсичного впливу на організм.

Ця задача вирішується тим, що досліджують біологічні зразки, проводять оцінку у якості одного з двох контрольних показників вмісту оксиду азоту у щурів, за зміною вмісту контрольних показників свідчать про виникнення дисфункції нирок при гіпертензії внаслідок впливу стресу.

Відрізняючими ознаками винаходу у порівнянні з прототипом є те, що

- у якості біологічних зразків використовують гомогенати тканин легень, серця та нирок,
- додатково у якості контрольного показника визначають вміст основ Шифа (ОШ) в нейтральних (НЛ) і фосфоліпідах (ФЛ),
- при підвищенні вмісту обох контрольних показників у серці свідчать про локальні патогенетичні зміни під впливом психоемоційного стресу,
- при підвищенні вмісту оксиду азоту та ОШ в НЛ у нирках свідчать про локальні патогенетичні зміни під сумісним впливом психоемоційного та токсичного стресу,
- при підвищенні лише вмісту ОШ в ФЛ легень свідчать про патогенетичні зміни у легенях під впливом токсичного стресу.

Використання у якості біологічних зразків гомогенатів тканин легень, серця та нирок обумовлено тим, що ці органи є найбільш уразливими за умов стрес-стимульованої гіпертензії, саме зміни в цих органах є патогенетичними.

Визначення в якості критерію окрім вмісту оксиду азоту концентрації ОШ обумовлено тим, що ОШ є кінцевими продуктами перекисного окислення ліпідів (ПОЛ), інтенсивність якого визначає стабільність і як наслідок реалізацію протекторних та регуляторних властивостей NO. За умов активації окислювальних процесів зростає ризик виникнення дефіциту NO на тлі незмінного його синтезу (внаслідок його руйнування або використання як антиоксиданту). Поєднана активація ПОЛ та синтезу NO призводить до утворення значної кількості високотоксичної сполуки - пероксинітриду, який є індуктором апоптозу та потужним фактором ураження тканин.

Визначення ОШ у фракціях ФЛ і НЛ зумовлено тим, що ці показники віддзеркалюють стан різних

ланок метаболізму ліпідів. ОШ в НЛ є характеристикою цитозольних ліпідів, ОШ в ФЛ - показником функціональної цілісності мембран.

Дослідження по запропонованому способу проведені в Інституті терапії АМН України. В результаті досліджень вмісту ОШ та оксиду азоту за умов емоційного та токсичного стресу у дорослих білих щурів виявлено, що одночасне підвищення вмісту ОШ і оксиду азоту спостерігається у серці під впливом психоемоційного стресу, який викликали дією електричного струму. Підвищення вмісту ОШ в ФЛ без змін вмісту оксиду азоту виявлено в легенях під впливом токсичного стресу, який викликане тривалою дією алкоголю. Підвищення вмісту оксиду азоту та ОШ в НЛ у нирках спостерігали в результаті сумісного впливу психоемоційного та токсичного стресу.

Використання способу, що заявляється, у порівнянні з прототипом, дозволяє оцінювати розвиток порушень функціонування внутрішніх органів, а саме легень, серця, нирок при гіпертензії на фоні емоційного та/або токсичного впливу на організм за рахунок підвищення специфічності та розширення області застосування (див. табл.).

Відтвореність - ступінь вірогідності відмінностей не перевищує 5%.

Таблиця

Перевага заявляемого способу над відомим (прототипом)

№	Показники, що порівнюють	Прототип	Заявляемый спосіб
1	Дослідний матеріал	Сеча щурів	Гомогенатами тканин легень, серця, нирок
2	Біохімічні критерії	Оксид азоту та циклічний гуанозинмонофосфат	Оксид азоту та ОШ в НЛ і ФЛ
3	Вид стресу, дію якого оцінюють	Окислювальний	Емоційний та/або токсичний
4	Розширення області застосування	Оцінка дисфункції нирок при гіпертензії	Оцінка дисфункції легень, серця, нирок при гіпертензії

Запропонований спосіб здійснюють у такій послідовності:

1 Для оцінки розвитку порушень функціонування внутрішніх органів при гіпертензії досліджують біологічні зразки експериментальних тварин.

2 Проводять оцінку змін вмісту контрольних показників, одним із яких є вміст оксиду азоту.

3 Згідно винаходу проводять біохімічне дослідження вмісту оксиду азоту та ОШ в НЛ і ФЛ серця, легень та нирок експериментальних тварин.

Для цього одночасно групі тварин провокують емоційний стрес, наприклад, шляхом болючих переривчастих (15 с - вплив, 45 с - перерва) електричних подразнень протягом 30 хв. Використовують освітлену камеру, до підлоги якої підведений

електричний струм, замикання контактів для його подачі здійснюють за допомогою маніпулятора. Порог чутливості визначають для кожної тварини індивідуально, напруга не вище 50В. Періодичність впливу - один сеанс раз на добу протягом 3-х тижнів до появи у щурів стійкої гіпертензії, яку контролюють по стабільно підвищеному артеріальному тиску або протягом 3-х місяців.

Модують токсичний стрес, наприклад, шляхом впливу алкоголю протягом 10 місяців прийому 30% спирту щодня без обмежень, окремі групи тварин - після дії електричного струму.

Тиск контролюють за допомогою медичного тонометра, для цього манжету накладають на хвіст.

Контрольна група - інтактні тварини відповідного віку.

Проводять декаптацію тварин, тканини органів (100 мг/мл) гомогенізують в фізіологічному розчині.

За запропонованим способом проводять біохімічне дослідження зразків тканин, яке включає визначення вмісту оксиду азоту та ОШ відомими методами.

Для дослідження оксиду азоту можна визначати вміст його стабільного метаболіту - нітриту. Для цього 1 мл гомогенатів центрифугують 10 хв при 5000 об/хв на центрифугі PC-6 при 4°C. Зберігають при -20°C до аналізу. Визначають вміст нітриту фотометричним методом за реакцією Гриса. Зразки депротейнізують додаванням 75 мМоль/л  $ZnSO_4$  та 55 мМоль/л  $NaOH$ , центрифугують 15 хв при 3000 об/хв. Вміст нітриту вимірюють у розчині, що містить 1% сульфонамід та 0,1% N-1-нафтилетилендіаміндігідрохлорид в 5 %  $HCl$  (див. Nakamura T, Ohyama Y, Masuda H et al. Chronic blockade of nitric oxide synthesis increases urinary endothelin-1 excretion // J of Hypertension -1997 - V 15, N 4 - P 373-382) за співвідношенням реагентів згідно (див. Смердова Л.Н., Кишко Т.О. Изучение влияния некоторых метаболитов на синтез оксидов азота перитонеальными макрофагами крыс // Укр біохім журн - 1999 - Т 71, N1 - С 128-135). Оптичну щільність визначають із використанням багатоканального мікроспектрофотометра фірми "Flow" (Великобританія) або колориметра типу КФК-3.

Дослідження ОШ проводять в гептан-ізопропанольних (4/6) екстрактах гомогенатів тканин згідно, наприклад (див. Львовская Е.И., Волчегорский И.А., Шемяков С.Е., Лифшиц Р.И. Спектрофотометрическое определение конечных продуктов перекисного окисления липидов // Вопросы мед химии -1991 - 37, N1 - С 92-93). Оптичну щільність визначають із використанням спектрофотометра СФ-26 (Росія).

4. Свідчать про локальні патогенетичні зміни під впливом психоемоційного стресу при підвищенні рівня обох контрольних показників у серці.

5. Свідчать про локальні патогенетичні зміни під сумісним впливом психоемоційного та токсичного стресу при підвищенні вмісту оксиду азоту та ОШ в НЛ у нирках.

6. Свідчать про патогенетичні зміни у легенях під впливом токсичного стресу при підвищенні вмісту ОШ в ФЛ легень без змін вмісту оксиду азо-

ту.

Можливість здійснення запропонованого способу підтверджується прикладами.

Приклад 1. Оцінка патогенетичних змін під впливом психоемоційного стресу.

Проводять біохімічне дослідження вмісту оксиду азоту та ОШ в НЛ і ФЛ серця, легень та нирок білих щурів.

Для цього викликають емоційний стрес, наприклад, шляхом болючих електричних подразнень одночасно груп тварин в результаті переривчастого впливу (15 с - вплив, 45 с - перерва) протягом 30 хв. Використовують освітлену камеру, до підлоги якої підведений електричний струм, замикання контактів для його подачі здійснюють за допомогою маніпулятора. Порог чутливості визначають для кожної тварини індивідуально, напруга не вище 50 В. Періодичність впливу - один сеанс раз на добу протягом 3-х тижнів до появи у щурів стійкої гіпертензії, яку контролюють по стабільно підвищеному АТ або протягом 3-х місяців. Контрольна група - інтактні тварини відповідного віку.

Проводять декаптацію тварин, тканини органів (100 мг/мл) гомогенізують в фізіологічному розчині.

За запропонованим способом проводять біохімічне дослідження зразків тканин, яке включає визначення вмісту оксиду азоту та ОШ відомими методами.

Для дослідження оксиду азоту 1 мл гомогенатів центрифугують 10 хв при 5000 об/хв на центрифугі PC-6 при 4°C. Зберігають при -20°C до аналізу. Визначають вміст стабільного метаболіту оксиду азоту - нітриту фотометричним методом за реакцією Гриса. Зразки депротейнізують і центрифугують, а потім вимірюють вміст нітриту, як вказано раніше. Оптичну щільність визначають із використанням багатоканального мікроспектрофотометру фірми "Flow" (Великобританія) або фотоколориметра КФК-3.

Дослідження ОШ проводять, як вказано вище. Оптичну щільність визначають із використанням спектрофотометра СФ-26 (Росія). Результати дослідження.

Вміст нітриту становить

- в легенях - 6,78 мкМоль/л гомогенату, (в контролі -  $7,15 \pm 0,34$ ) - нижче контрольного рівня,

- в серці - 8,16 (в контролі -  $6,72 \pm 0,19$ ) - вище контрольного рівня,

- в нирках - 6,82 (в контролі -  $6,1 \pm 0,13$ ) - вище контрольного рівня,

вміст ОШ в НЛ становить

- в легенях - 0,9  $\Delta E/g$  тканини, (в контролі -  $0,61 \pm 0,05$ ) - вище контрольного рівня,

- в серці - 0,41 (в контролі -  $0,29 \pm 0,09$ ) - вище контрольного рівня,

- в нирках 0,49 (в контролі -  $0,32 \pm 0,07$ ) - вище контрольного рівня,

вміст ОШ в ФЛ становить

- в легенях - 11,88 (в контролі -  $10,8 \pm 1,4$ ) - не відрізняється від контрольного,

- в серці - 2,58 (в контролі -  $1,6 \pm 0,1$ ) - вище контрольного рівня,

- в нирках - 2,48 (в контролі -  $2,1 \pm 0,32$ ) - не відрізняється від контрольного.

Свідчать про локальні патогенетичні зміни під

впливом психоемоційного стресу при підвищенні рівня обох контрольних показників у серці

Приклад 2 Оцінка патогенетичних змін під впливом токсичного стресу

Проводять біохімічне дослідження вмісту оксиду азоту та ОШ в НЛ і ФЛ серця, легень та нирок щурів

Модулюють токсичний стрес, наприклад, шляхом впливу алкоголю протягом 10 місяців прийому 30% спирту щодня без обмежень, окремій групі тварин - після дії електричного струму. Тиск контролюють за допомогою медичного тонометра, для цього манжету накладають на хвіст. Контрольна група - інтактні тварини відповідного віку

Проводять декаптацію тварин, тканини органів (100 мг/мл) гомогенізують в фізіологічному розчині

За запропонованим способом проводять біохімічне дослідження зразків тканин, яке включає визначення вмісту оксиду азоту та ОШ відомими методами

Результати дослідження

Вміст стабільного метаболіту оксиду азоту - нітрити становить

- в легенях - 7,2 мкмоль/л гомогенату, (в контролі -  $7,15 \pm 0,34$ ) - не відрізняється від контрольного,

- в серці - 6,51 (в контролі -  $6,72 \pm 0,19$ ) - не відрізняється від контрольного,

- в нирках - 6,15 (в контролі -  $6,1 \pm 0,13$ ) - не відрізняється від контрольного,

вміст ОШ в НЛ становить

- в легенях - 1,1 ΔЕ/г тканини, (в контролі -  $0,61 \pm 0,05$ ) - вище контрольного рівня,

- в серці - 0,27 (в контролі -  $0,29 \pm 0,09$ ) - не відрізняється від контрольного,

- в нирках - 0,39 (в контролі -  $0,32 \pm 0,07$ ) - не відрізняється від контрольного,

вміст ОШ в ФЛ становить

- в легенях - 12,55 (в контролі -  $10,8 \pm 1,4$ ) - вище контрольного рівня,

- в серці - 2,26 (в контролі -  $1,6 \pm 0,1$ ) - вище контрольного рівня,

- в нирках - 2,42 (в контролі -  $2,1 \pm 0,32$ ) - не відрізняється від контрольного

Свідчать про патогенетичні зміни у легенях під впливом токсичного стресу при підвищенні вмісту ОШ в ФЛ легень

Приклад 3 Оцінка патогенетичних змін під сумісним впливом психоемоційного та токсичного стресу

Проводять біохімічне дослідження вмісту оксиду азоту та ОШ в НЛ і ФЛ серця, легень та нирок білих щурів

Викликають емоційний стрес, наприклад, шля-

хом болючих електричних подразнень, періодичність впливу - один сеанс раз на добу протягом 3-х тижнів, а токсичний стрес шляхом впливу алкоголю протягом 10 місяців прийому 30% спирту щодня без обмежень, окремій групі тварин - після дії електричного струму. Контрольна група - інтактні тварини відповідного віку

Проводять декаптацію тварин, тканини органів (100 мг/мл) гомогенізують в фізіологічному розчині

За запропонованим способом проводять біохімічне дослідження зразків тканин, яке включає визначення вмісту оксиду азоту та ОШ відомими методами

Результати дослідження

Вміст стабільного метаболіту оксиду азоту - нітрити становить

- в легенях - 6,81 мкмоль/л гомогенату, (в контролі -  $7,15 \pm 0,34$ ) - не відрізняється від контрольного,

- в серці - 6,58 (в контролі -  $6,72 \pm 0,19$ ) - не відрізняється від контрольного,

- в нирках - 9,11 (в контролі -  $6,1 \pm 0,13$ ) - вище контрольного рівня,

вміст ОШ в НЛ становить

- в легенях - 1,5 ΔЕ/г тканини, (в контролі -  $0,61 \pm 0,05$ ) - вище контрольного рівня,

- в серці - 0,71 (в контролі -  $0,29 \pm 0,09$ ) - вище контрольного рівня,

- в нирках - 1,1 (в контролі -  $0,32 \pm 0,07$ ) - вище контрольного рівня,

вміст ОШ в ФЛ становить

- в легенях - 13,60, (в контролі -  $10,8 \pm 1,4$ ) - вище контрольного рівня,

- в серці - 1,72 (в контролі -  $1,6 \pm 0,1$ ) - не відрізняється від контрольного

- в нирках - 1,99 (в контролі -  $2,1 \pm 0,32$ ) - не відрізняється від контрольного

Свідчать про локальні патогенетичні зміни під сумісним впливом психоемоційного та токсичного стресу при підвищенні вмісту оксиду азоту та ОШ в НЛ у нирках

Висновок Вказані приклади підтверджують можливість здійснення оцінки розвитку порушень функціонування внутрішніх органів, а саме легень, серця, нирок при гіпертензії в експерименті на фоні емоційного та/або токсичного впливу на організм з високою достовірністю та відтворюваністю

Технічний результат

Використання запропонованого способу в експериментальній медицині дозволяє оцінювати розвиток порушень функціонування внутрішніх органів, а саме легень, серця, нирок при гіпертензії на фоні емоційного та/або токсичного впливу на організм