



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **71656** (13) **U**
(51) МПК
G01N 33/50 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2011 14809	(72) Винахідник(и): Золотарьова Тетяна Ананіївна (UA), Павлова Олена Семенівна (UA), Бахолдіна Олена Іванівна (UA), Олешко Олексій Яковлевич (UA), Родомакін Михайло В'ячеславович (UA)
(22) Дата подання заявки: 13.12.2011	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.07.2012	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.07.2012, Бюл.№ 14	(73) Власник(и): ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "УКРАЇНСЬКИЙ НАУКОВО ДОСЛІДНИЙ ІНСТИТУТ МЕДИЧНОЇ РЕАБІЛІТАЦІЇ ТА КУРОРТОЛОГІЇ МІНІСТЕРСТВА ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ", Лермонтовський провулок, 6, м. Одеса, 65014 (UA)

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ ЕНДОГЕННОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ

(57) Реферат:

Спосіб діагностики ендогенної інтоксикації шляхом використання Т-лімфоцитів включає додавання рідкого біологічного середовища у розведену суспензію Т-лімфоцитів. Після підраховують кількість розеткоутворюючих клітин та визначають наявність ендогенної інтоксикації.

UA 71656 U

Корисна модель належить до експериментальної медицини і присвячена діагностиці проявів ендогенної інтоксикації (EI) при хронічних процесах.

EI - це неспецифічний синдром, який погіршує перебіг патологічних процесів внаслідок накопичення у концентраціях значно більших за фізіологічні, токсичних продуктів метаболізму на тлі пригнічення функціонального стану систем ендогенної детоксикації. У зв'язку з цим, важливою являється розробка інформативних засобів діагностики проявів EI.

Найбільш відомі методи виявлення проявів EI при тяжких станах (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), що потребує застосування інформативних методів діагностики, розроблених з врахуванням особливостей патогенезу хронічних процесів.

Основні засоби діагностики EI базуються на визначенні у сироватці або плазмі крові гуморальних речовин - молекул середньої маси (МСМ), сечовини, білірубину, продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), ферментів протеолізу тощо, накопичення яких в концентраціях, що перевищують фізіологічні, супроводжуються токсичним ефектом. У першу чергу це відноситься до їх пошкоджуючої дії на клітинні мембрани та порушення функціонального стану клітин. Разом з цим, наявність прямих доказів пошкоджуючої дії токсичних метаболітів на функціональний стан різних клітин організму недостатня, та потребує вивчення прямої дії цих речовин на функціональний стан клітин організму.

У зв'язку з цим, приваблюють увагу методи біотестування в основі яких лежить дослідження впливу біологічної рідини, одержаної від хворих або тварин з ознаками EI (сироватка крові, плазма крові, сеча) на функціональну активність різних клітин в досліді in vitro.

Існує спосіб діагностики EI [1], основу якого складає визначення впливу токсичних речовин сечі на рухомість сперматозоїдів бика. Слід підкреслити, що ця тест-система широко використовується для оцінки токсичної (пірогенної) дії різних медичних виробів та лікарських засобів.

В основі способу лежить дослідження активності рухомості сперматозоїдів в залежності від часу дії токсичних метаболітів, що знаходяться у сечі.

Спосіб виконується наступним чином. Сечу розводять глюкозоцитратним середовищем (глюкоза - 4 г, цитрат натрію 1 г, дистильована вода - 100 мл) у співвідношенні 1:2. До розведеної сечі додають тест-систему - суспензію сперматозоїдів бика у вигляді заморожених гранул. Токсичну дію сечі оцінюють по її обмежуючому впливу на рухомість сперматозоїдів. Інтенсивність рухомості сперматозоїдів (S) оцінюють на аналізаторі токсичності AT-04; результати порівнюють з даними контролю (гранули сперматозоїдів + глюкозоцитратне середовище) з подальшим розрахунком індексу токсичності сечі Im . Im - співвідношення $S_{\text{дослід}}/S_{\text{контролю}}$. Чим нижче значення Im , тим вище токсичність сечі яка досліджувалась.

На підставі одержаних даних роблять висновки, що цей тест відображає рівень EI у хворих на алергічні захворювання та може бути застосовано як контроль за ефективністю терапії.

Але спосіб потребує наявності у лабораторії стандартної суспензії заморожених гранул сперматозоїдів бика; апарату за контролем рухомості сперматозоїдів - аналізатор токсичності AT-04. Використання як контроль системи глюкозоцитратного розчину - сперматозоїдів бика, недостатньо для коректної оцінки результатів. Більш адекватним є використання для контролю сечі здорової людини, що дасть можливість об'єктивно довести токсичну дію сечі хворих.

Відомий спосіб діагностики EI [2] заснований на визначенні властивості еритроцитів периферійної крові абсорбувати продукти метаболізму, що накопичуються в крові хворих. Спосіб виконують шляхом додавання до 1 мл еритроцитарної маси зразка крові, що досліджується, розчину вітального барвника і після процедури інкубації та центрифугування визначається оптична щільність розчину.

Абсорбційна здатність еритроцитів нарастає залежно від тяжкості процесу. Так, найбільший відсоток поглинання барвника виявлений 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 міокарда цей показник складав усього $44,1 \pm 5,8\%$ та не відрізнявся від норми ($p > 0,5$).

Разом з тим метод має ряд суттєвих недоліків:

1. Метод інформативний тільки при його використанні в умовах тяжких проявів EI, та не підходить для встановлення проявів EI в умовах хронічних процесів;

2. Спосіб рекомендовано для застосування як експрес-метод, у зв'язку з чим не доведена доцільність його використання як контролю за ефективністю лікування;

3. Метод відображає тільки інтенсивність накопичення токсичних продуктів і не відображає стан систем детоксикації (антиоксидантна система (АОС), імунна система, фільтраційна здатність нирок).

Найбільш близьким до заявленого способу є спосіб діагностики запропонований для визначення EI у хворих із черепно-мозковими травмами [3].

В основі способу лежить визначення МСМ та кількості Т-лімфоцитів у периферійній крові хворих. Визначення МСМ виконували загальноприйнятим методом, а кількість Т-лімфоцитів та їх субпопуляцій (Т-хелпери, Т-супресори) за методом розеткоутворення з еритроцитами барану.

Встановлено зв'язок між важкістю стану хворих, рівнем МСМ - основного маркера EI та загальною кількістю Т-лімфоцитів та співвідношенням субпопуляції Т-лімфоцитів (Т-хелпери/Т-супресори). Найбільше підвищення вмісту МСМ та зниження кількості Т-лімфоцитів, зсуви у співвідношенні Т-х/Т-с спостерігалось у хворих з більш тяжким перебігом захворювання.

Застосування таких показників, як визначення МСМ та показників стану Т-системи лімфоцитів дозволяє одержувати уявлення про вираженість проявів EI та механізми формування вторинної імундепресії, яка розвивається у хворих з черепно-мозковою травмою.

Але цей спосіб має ряд недоліків:

1) Він відображає тільки факт зниження Т-лімфоцитів у крові відповідно до тяжкості патологічного процесу, але не дає відповіді за рахунок яких речовин порушується функціональна активність Т-лімфоцитів, що фіксується у тесті розеткоутворення;

2) Для виконання процедури метода необхідно отримати у хворих значний обсяг крові для виділення суспензії Т-лімфоцитів та їх субпопуляцій, та проведення процедури розеткоутворення у динаміці, на кожному етапі лікування, що обумовлює великий обсяг роботи.

В основу корисної моделі поставлена задача визначення впливу токсичних речовин, що знаходяться у крові хворих та обумовлюють прояви EI, *in vitro* використовуючи для цього суспензію Т-лімфоцитів (біотестування), що дозволить значно спростити спосіб та підвищити його інформативність.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі діагностики EI, згідно з корисною моделлю, у виділену з крові здорових тварин суспензію Т-лімфоцитів додають рідке біологічне середовище (наприклад сироватку крові) та після підрахування кількості розеткоутворюючих клітин - по пригніченій функції лімфоцитів визначають наявність EI.

Суть способу полягає у тому, що визначають вплив токсичної речовини сироватки крові на функціональний стан Т-клітин по їх здібності утворювати розетки з еритроцитами барану (розеткоутворення). Токсичні речовини, що знаходяться у сироватці крові щурів з EI, можуть блокувати рецептори Т-лімфоцитів і значно зменшувати їх здатність утворювати розетки, тобто блокують функціональну активність цих клітин.

Спосіб виконується наступним чином. Виділену з периферійної крові здорових (інтактних) щурів традиційним методом суспензію Т-лімфоцитів розводять до стандартної концентрації - 2×10^6 клітин в $1,0 \text{ см}^3$ розчину.

До $0,1 \text{ см}^3$ суспензії лімфоцитів додають $0,1 \text{ см}^3$ сироватки дослідних тварин розведеної фізіологічним розчином 1:10 та інкубують протягом 30 хв. при 37°C . Після експозиції додають $0,1 \text{ см}^3$ 0,5 % зависі гетерогенних еритроцитів барана, інкубують 5 хв. при 37°C потім центрифугують 5 хв. при 1500 об/хв. та інкубують протягом 60 хв. при 4°C для припинення реакції. У кожен пробірник додають $0,02 \text{ см}^3$ фіксатора та залишають на 10 хв. при кімнатній температурі. У пробірник додають по 7 см^3 дистильованої води та центрифугують 5 хв. при 1500 об/хв. Осад ресуспензують та роблять мазки, які після висихання, фарбують барвником-фіксатором Май-Грюнвальда з подальшою мікроскопією, з підрахунком розеткоутворюючих клітин на 200 лімфоцитів.

Спосіб апробовано на моделі емоційно-імобілізаційного хронічного стресу (EIXC).

На основі верифікованих показників EI - МСМ, визначення вмісту циркулюючих імунних комплексів (ЦІК), величин лейкоцитарного індексу інтоксикації (ЛІІ), активності ПОЛ [4], було підтверджено наявність прояв EI на протязі розвитку патологічного процесу в умовах цієї моделі.

Одночасно, визначався вплив сироватки крові, одержаної на 15-ту та 30-ту добу моделювання на функціональну активність (розеткоутворення) Т-лімфоцитів інтактних тварин.

Приклад: Дослідження проведені на моделі хронічного стресу EIXC у щурів, яку відтворювали шляхом розміщення тварин по 3 години на добу в окремих клітках-пеналах, протягом 30 діб. Як це наведено у таблиці 1 на 15-ту добу формування EIXC у щурів суттєво підвищується вміст МСМ₂₅₄, вміст ЦІК, величина ЛІІ, та активність ПОЛ, що свідчить про наявність EI. У таблиці 1 наведені показники маркерів EI на різних етапах розвитку процесу.

Таблиця 1

Показники	Інтактні щури	15-та доба ЕІХС	Р	30-та доба ЕІХС	Р
МСМ 254, у.ед	0,34±0,02	0,57±0,01	<0,05	0,59±0,02	<0,05
МСМ 280, ум. од	0,22±0,01	0,26±0,01	<0,05	0,28±0,02	<0,05
ЦІК, мг/мл	5,7±0,2	6,97±0,23	<0,001	6,62±0,16	<0,001
ЛІІ, ум.од.	0,080±0,010	0,106±0,014	>0,5	0,140±0,010	<0,001
ПОЛ (МДА), нмоль/(хв.·мг)	5,94±0,21	8,43±0,46	<0,05	8,54±0,32	<0,05

Р - розраховано відносно показників інтактних щурів.

- 5 У той же час, як це наведено у таблиці 2, сироватка крові тварин з моделлю ЕІХС, що одержана на 15-ту добу моделювання, суттєво обмежує Т-лімфоцити здорових тварин створювати розетки. Кількість розеткоутворюючих Т-лімфоцитів, оброблених сироваткою дослідних тварин (модель ЕІХС), була суттєво нижче по відношенню до кількості розеткоутворюючих клітин (Т-РУК) оброблених сироваткою інтактних тварин ($p<0,001$).

Таблиця 2

Показники	Кількість Т-РОК після обробки суспензії лімфоцитів інтактних тварин сироваткою:		
	від інтактних тварин (контроль)	від щурів на 15-ту добу моделювання ЕІХС (дослід)	від щурів на 30-ту добу моделювання ЕІХС (дослід)
Кількість Т-РУК, %	42,5±1,5	32,5±2,0 $p<0,001$	33,0±1,7 $p<0,001$

Р - розраховано відносно контролю.

- 10 На 30-ту добу спостережень залишались підвищеними середні величини маркерів ЕІ і також була суттєво знижена кількість розеткоутворюючих Т-лімфоцитів, які оброблялись сироваткою тварин, що одержана на 30-ту добу моделі. Тобто, токсичні речовини, які накопичуються у сироватці крові тварин із моделлю ЕІХС обмежують функціональну активність Т-лімфоцитів, що підтверджується зниженням їх здібності до розеткоутворення.
- 15 Розроблений спосіб також може буде застосований і для контролю ефективності дії різних лікувальних факторів.
- Наприклад: Сироватка щурів, з моделлю ЕІХС, які одержували мінеральну воду (МВ) "Березівська" протягом 30-ти діб (тривалість існування моделі) не пригнічувала здатність Т-лімфоцитів здорових щурів створювати розетки. Середні величини розеткоутворюючих клітин у даному випадку не відрізнялись від даних контролю (кількість розеткоутворюючих Т-лімфоцитів оброблених сироваткою інтактних тварин) та були суттєво вище ніж кількість розеткоутворюючих клітин у випадку обробки лімфоцитів сироваткою, від тварин, які не одержували МВ (контроль).
- 20 Як це наведено у таблиці 3, це корелювало з нормалізацією маркерів ЕІ - МСМ₂₈₀, МСМ₂₅₄, рівню ЦІК, величини ЛІІ, та активності ПОЛ. У таблиці 3 наведенні показники маркерів ЕІ у щурів з моделлю ЕІХС, що одержували курс МВ "Березівська".
- 25

Таблиця

Показники	30-та доба ЕІХС (контроль 1)	Інтактні щури (контроль 2)	Вплив МВ "Березівська"		
			(дослід)	P ₁	P ₂
МСМ 254, у.ед	0,59±0,02	0,34±0,02	0,30±0,01	<0,01 ↓	>0,5
МСМ 280, ум.од	0,28±0,02	0,22±0,01	0,21±0,01	<0,05 ↓	>0,5
ЦІК, мг/мл	6,62±0,16	5,7±0,2	5,49±0,25	<0,005	>0,5
ЛІІ, ум.од	0,140±0,010	0,080±0,010	0,07±0,01	<0,001	>0,5
ПОЛ (МДА), нмоль/(хв·мг)	8,54±0,32	5,94±0,21	5,43±0,36	<0,05 ↓	>0,5

P₁ - розраховано відносно показників щурів з моделлю ЕІХС (контроль 1);

P₂ - розраховано відносно показників інтактних щурів (контроль 2).

Таким чином, спосіб діагностики ЕІ має ряд переваг перед існуючими:

5 1. Для його використання необхідно мінімальний обсяг сироватки (0,1 мл), що дає змогу проводити *in vitro* дослідження в динаміці на всьому протязі спостережень, не вбиваючи тварин.

2. Спосіб може бути використано протягом будь-якого терміну у випадку контролю за ефективністю дії лікарських засобів.

3. На підставі використання засобу може бути складено уявлення про стан Т-клітинної ланки імунної системи та її активації, як однієї з важливих систем ендогенної детоксикації у процесі вивчення ефективності різних лікувальних засобів.

Джерела інформації:

1. Новый метод диагностики эндогенной интоксикации и его клиническое значение [Электронный ресурс] / О.А. Ежова // - Режим доступа http://www.bronho.ru/articles_7.html.

15 2. Способ диагностики эндогенной интоксикации / Тогойбаев А.А., Кургузкин А.В., Рикун И.В., Карибжанова Р.М. // Лабораторное дело.-1988. - № 9. - С. 22-24.

3. Ковалев Г.И. Взаимосвязь эндогенной интоксикации и иммунотерапии в патогенезе черепно-мозговой травмы / Г.И. Ковалев, А.М. Томнаков, Т.Г. Музлаев // Неврология и психиатрия.-1995. - Т. 95, № 6. - С. 4-6. - прототип.

4. Методичні рекомендації з методів досліджень біологічної дії природних лікувальних ресурсів та преформованих лікувальних засобів: мінеральні природні лікувально-столові та лікувальні води, напої на їхній основі; штучно-мінералізовані води; пелоїди, розсоли, глини, воски та препарати на їхній основі / за ред. Т.А. Золотарьова, Б.А. Насібуллін, Н.О. Алексеенко, О.С. Павлова, О.Я. Олешко; Укр.НДІ МР та К. - К., 2009 р.-118 с.

25 ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб діагностики ендогенної інтоксикації шляхом використання Т-лімфоцитів, який **відрізняється** тим, що у виділену з крові здорових тварин та розведену суспензію Т-лімфоцитів додають рідке біологічне середовище, наприклад сироватку, та після підрахування кількості розеткоутворюючих клітин - по пригніченню функції лімфоцитів - визначають наявність ендогенної інтоксикації.

Комп'ютерна верстка Л. Купенко

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601