



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) UA

(11) 96039

(13) U

(51) МПК

G01N 33/48 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2014 09130**

(22) Дата подання заявки: **14.08.2014**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **12.01.2015**

(46) Публікація відомостей **12.01.2015, Бюл.№ 1**
про видачу патенту:

(72) Винахідник(и):

**Багмут Ірина Юріївна (UA),
Кліменко Микола Олексійович (UA),
Жуков Віктор Іванович (UA)**

(73) Власник(и):

**ХАРКІВСЬКА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ
ПІСЛЯДИПЛОМНОЇ ОСВІТИ,
вул. Корчагінців, 58, м. Харків, 61176 (UA)**

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ ЕНДОГЕННОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ ТВАРИН ОЛІГОЕФІРАМИ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

(57) Реферат:

Спосіб діагностики ендогенної інтоксикації тварин олігоефірами в експерименті включає затравлення експериментальних тварин дозами летальними і сублетальними, вимірювання інтенсивності посиленої H_2O_2 біохемолюмінісценції (БХЛ) сироватки крові через визначені проміжки часу протягом інтервалу часу, побудову за експериментальними даними динамічних кривих БХЛ, порівняння значень інтенсивності БХЛ зі значеннями інтенсивності контрольної групи тварин. Проводять дослідження функціонального стану мітохондрій гепатоцитів в процесі розвитку структурно-метаболического пошкодження тканини печінки, викликаного введенням токсичної дози олігоефірів $1/10 LD_{50}$. Визначають швидкість споживання кисню в безакцепторному середовищі (V_4). Швидкість споживання кисню в присутності акцептора (V_3). Швидкість споживання кисню після вичерпання додається АДФ (V_4). Розраховують коефіцієнт фосфорилювання - відношення $АДФ/O_2$, дихальний коефіцієнт (ДК) Ларді, а саме відношення швидкості поглинання кисню у стані V_3 до швидкості поглинання кисню у стані V_4 (до введення в комірку АДФ); АТФ - активність гідролазних реакцій як відношення V_4/V_4^P , що характеризує швидкість регенерації АДФ після його фосфорилювання. Як субстрат окиснення використовують сукцинат, падіння величин дихального коефіцієнта і коефіцієнта фосфорилювання дають підставу судити про роз'єднання дихання та окисного фосфорилювання на фоні пригнічення продукції АТФ, що свідчить про ендогенну інтоксикацію.

UA 96039 U

Корисна модель належить до медицини, а саме до експериментальної медицини, і може бути використана для діагностики проявів ендогенної інтоксикації (EI).

З розвитком хімії, хімічної промисловості та фармації збільшилася кількість чужорідних речовин, що застосовуються в різних галузях народного господарства. Багато з цих сполук виявилися токсичними і небезпечними для людини і навколишнього середовища. В певних умовах, особливо на виробництві, вони можуть бути причиною розвитку гострих та хронічних отруєнь. Деякі ксенобіотики, що виробляються хімічною промисловістю, здатні завдавати непоправної шкоди флорі і фауні. Підприємства хімії органічного синтезу стали одним з найпотужніших джерел забруднення навколишнього середовища за останні 20-30 років. Так, виробництва поліоксипропіленполіолів, які випускають великий обсяг і асортимент різних марок олігоетерів, впроваджують десятки нових синтезованих речовин, що використовуються для одержання пластмас, еластичних і блокових поліуретанів, термопластів, пінопластів, епоксидних смол, лаків, емалей та ін., які несуть потенційну і реальну загрозу здоров'ю населення та робітників, зайнятих на їх виробництві.

Відомий спосіб діагностики ендогенної інтоксикації, який здійснюють шляхом визначення молекул середньої маси у сироватці крові тварин [Попов А.Н. Эндотоксемия при экспериментальной ахолии / А.Н. Попов, М.М. Минненбаев // БЭБ иМ. - 1997. - Т. 1. - С. 101-102].

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

Недоліки метода:

1. Спосіб 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.

Відомий спосіб встановлення тяжкості і результату отруєння ксенобіотиками. [Красовский Г.Н., Жуков В.И., Бондаренко Л.А. Применение метода БХЛ в санитарно-токсикологических исследованиях // Гигиан. - 1989. - № 11. - С. 35-39]. У гострому досліді на білих щурах і мишах визначали інтенсивність надслабкого світіння внутрішніх органів і тканин при пероральному введенні простих полієфірів у летальних і сублетальних дозах. Досліджували БХЛ органів і сироватки крові тварин у динаміці через 1, 3, 6, 9, 12 годин (середній час загибелі тварин $ET_{50}=12$ год.). Інтенсивність БХЛ індукували 3 % перекисом водню. По інтенсивності світіння і характеру кривої судили про тяжкість і результат отруєння ксенобіотиками.

Цей спосіб вибраний нами як прототип, як найбільш близьке технічне рішення. Недоліками цього способу є те, що він не дозволяє визначати зміни трофотропної та ерготропної функції клітин.

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалення способу діагностики ендогенної інтоксикації тварин олігоєфірами в експерименті, в якому за рахунок зміни досліджуваних показників, досягається визначення змін трофотропної та ерготропної функцій клітин за рахунок показників змін метаболізму клітин або гепатоцитів.

Поставлена задача вирішується в способі діагностики ендогенної інтоксикації тварин олігоєфірами в експерименті, що включає затравлення експериментальних тварин дозами летальними і сублетальними, вимір інтенсивності посиленої H_2O_2 біохемолюмінісценції (БХЛ) сироватки крові через визначені проміжки часу протягом інтервалу часу, побудову по експериментальних даних динамічних кривих БХЛ, порівняння значень інтенсивності БХЛ зі значеннями інтенсивності контрольної групи тварин, згідно з корисною моделлю, додатково проводять дослідження функціонального стану мітохондрій гепатоцитів в процесі розвитку структурно-метаболічного пошкодження тканини печінки, викликаного введенням токсичної дози олігоєфірів $1/10 LD_{50}$, визначають швидкість споживання кисню в безакцепторному середовищі (V_4), швидкість споживання кисню в присутності акцептора (V_3), швидкість споживання кисню після вичерпання додається АДФ (V_4), а також розраховують коефіцієнт фосфорилювання - відношення $АДФ/O_2$, дихальний коефіцієнт (ДК) Ларді, а саме відношення швидкості поглинання кисню у стані V_3 до швидкості поглинання кисню у стані V_4 (до введення в комірку АДФ); АТФ - активність гідролазних реакцій як відношення V_4/V_4^P , що характеризує швидкість регенерації АДФ після його фосфорилювання, як субстрат окиснення використовують сукцинат, падіння величин дихального коефіцієнта і коефіцієнта фосфорилювання дають підставу судити про

роз'єднання дихання та окисного фосфорилювання на фоні пригнічення продукції АТФ, що свідчить про ендogenous інтоксикацію.

Падіння величин дихального коефіцієнта і коефіцієнта фосфорилювання дають підставу судити про роз'єднання дихання та окисного фосфорилювання на фоні пригнічення продукції АТФ, що пов'язано з порушенням фізико-хімічних та структурно-метаболических властивостей мітохондріальних мембран.

Спосіб, що заявляється, здійснюють таким чином.

В роботі була використана нова група олігоефірів на основі окису етилену і пропілену марок Л-501-2-100 (ацеталі монометилового ефіру поліоксietiленгліколя), Л-1601-2-50"Б" (бутилаліловий ефір поліоксипропіленоксietiленгліколю) і Л-1601-2-50"Р" (ацеталімонобутилового ефіру поліоксипропіленоксietiленгліколю) з регламентованими фізико-хімічними властивостями. Вибір даної групи олігоефірів був обґрунтований відсутністю в науковій літературі даних про механізми їх біологічної дії і необхідністю розробки прогностичної характеристики потенційної небезпеки цих сполук для людини і теплокровних тварин. На підставі оцінки параметрів гострої токсичності дані сполуки належать до помірно- і малотоксичних сполук, мають кумулятивних властивостей.

Програма досліджень передбачає проведення підгострого токсикологічного експерименту на статевозрілих білих щурах популяції Вістар масою 180-200 гр. згідно з умовами експерименту, тваринам протягом 45 діб щоденно вранці, до годівлі, перорально за допомогою металевого зонда внутрішньошлунково вводили водні розчини олігоефірів у дозах 1/10; 1/100; 1/1000 LD50 (9 груп з n=10 тварин). Контрольна група тварин (n=10) отримувала еквівалентні обсяги питної води. У токсикологічному експерименті було використано 100 білих щурів при дотриманні вимог біоетики та принципів "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей" (Страсбург, 1986). По закінченні підгострого досвіду на першому етапі оцінюють стан енергетичного та вуглеводно-фосфорного обміну. Для цього були проведені дослідження функціонального стану мітохондрій гепатоцитів в процесі розвитку структурно-метаболического пошкодження тканини печінки, викликаного введенням токсичної дози олігоефірів 1/10 LD50. Оцінку метаболического стану мітохондрій проводили полярографічним методом [Мешкова Н.П., Северин С.Е. Практикум по біохімії. М.: МГУ, 1979. 428 с.], визначають швидкість споживання кисню в безакцепторному середовищі (V_4), швидкість споживання кисню в присутності акцептора (V_3), швидкість споживання кисню після вичерпання додається АДФ (V_4), а також розраховують коефіцієнт фосфорилювання - відношення АДФ/ O_2 , схоже за своїм значенням з коефіцієнтом P/O і характеризує спряженість процесів окислення та фосфорилювання в дихальному ланцюзі; дихальний коефіцієнт (ДК) Ларді, тобто відношення швидкості поглинання кисню у стані V_3 до швидкості поглинання кисню у стані V_4 (до введення в комірку АДФ); АТФ - активність гідролізних реакцій як відношення V_4/V_4^P , характеризує швидкість регенерації АДФ після його фосфорилювання. Як субстрат окиснення використовували сукцинат.

Загальноприйнятими методами [Мешкова Н.П., Северин С.Е. Практикум по біохімії. М.: МГУ, 1979. 428 с.] у печінці визначають Mg^{2+} , Ca^{2+} - активовану АТФ-азу мітохондрій гепатоцитів, гексокиназу, фосфофруктокиназу, альдолазу, глюкозо-6-фосфатдегідрогеназу (Г-6-ФДГ), лактатдегідрогеназу (ЛДГ), креатинфосфокіназу (КФК).

Виявлено порівняно з контролем інгібування дихання мітохондрій після додавання сукцинату (у метаболическому стані V_4), АДФ (V_3) і разобшителя - 2,4 - динітрофенолу (V_4^P). Ці процеси супроводжуються зменшенням величини дихального коефіцієнта і коефіцієнта фосфорилювання. Було встановлено зниження дихання мітохондрій у метаболическому стані V_4 на -38,8 %; 34,52 % і 37,16 %; V_3 -51,16 %; 48,7 % і 50,10 %; V_4^P -57,3 %; 56,12 % і 49,77 %, відповідно під впливом Л-501-2-100, Л-1601-2-50"Б" і Л-1601-2-50"Р" по зрівнянню з показниками в інтактній групі. При цьому відзначалося зниження величини дихального коефіцієнта на -19,10 %; 20,24 % і 20,53 %, коефіцієнта фосфорилювання - 58,75 %; 53,85 % і 61,54 %, відповідно у групі тварин, токсифікованих Л-501-2-100, Л-1601-2-50"Б" і Л-1601-2-50"Р". Активність мітохондріальної Ca^{2+} і Mg^{2+} - залежної АТФ-ази також суттєво послаблювалася під впливом досліджуваних олігоефірів. Так, активність Mg^{2+} - АТФ-ази знижена на 50,51 %; 48,10 % і 37,55 %; Ca^{2+} - залежної АТФ-ази - 53,53 %; 49,30 % і 37,5 %. Схожа динаміка була властива і для H^+ - АТФ-ази, активність цього ензиму знижувалася відповідно на 55,8 %; 53,02 % і 59,17 %.

Результати дослідження метаболического стану мітохондрій гепатоцитів щурів, що піддавалися впливу ксенобіотиків у дозі 1/10 LD50, представлені в табл.

Таблиця

Метаболічний стан мітохондрій гепатоцитів щурів
в умовах підгострого дослідження під впливом олігоєфірів в дозі 1/10 LD50

Показники	Група спостереження, M±m			
	Контроль n=10	Л-501-2-100 n=10	Л-1601-2-50"Б" n=10	Л-1601-2-50"Р" n=10
Дихання мітохондрій після додавання сукцинату (V4), нмоль O ₂ /хв·мг білка	1,83±0,16	1,12±0,05*	1,18±0,07*	1,15±0,06*
Дихання після додавання АДФ (V3), нмоль O ₂ /хв·мг білка	6,35±0,57	3,14±0,18*	3,26±0,22*	3,17±0,25*
Дихання після додавання роз'єднувача 2,4-ДНФ (V4 ^P), нмоль O ₂ /хв·мг білка	7,68±0,73	3,28±0,24*	3,37±0,33*	3,19±0,28*
Дихальний коефіцієнт, ДК=V3/V4, відн. од.	3,46±0,36	2,80±0,12*	2,76±0,20*	2,75±0,15*
Коефіцієнт фосфорилювання, АДФ/O ₂	2,86±0,25	1,18±0,05*	1,32±0,07*	1,10±0,04*
Mg ²⁺ -АТО-аза (мкмоль Рн/мг білка-1 ч)	84,32±6,10	41,73±3,44*	43,80±2,96*	39,76±3,52*
Ca ²⁺ - АТФ-аза (мкмоль Рн/мг білка-1 ч)	69,84±4,53	32,46±2,75*	35,42±2,58*	43,62±3,78*
H ⁺ - АТФ-аза (мкмоль Рн/мг білка-1 ч)	77,54±5,83	34,27±2,56*	36,43±3,25*	31,66±3,15*

Примітка: * - розбіжності з контролем достовірні, p<0,05.

Падіння величин дихального коефіцієнта і коефіцієнта фосфорилювання дають підставу судити про роз'єднання дихання та окисного фосфорилювання на фоні пригнічення продукції АТФ, що може бути пов'язано з порушенням фізико-хімічних та структурно-метаболічних властивостей мітохондріальних мембран. Ці дані підтверджуються також зниженням ферментативної активності Ca²⁺ - АТФ-ази, Mg²⁺-АТФ-ази і H⁺ - АТФ-ази, що в комплексі виявлених змін вказує на пригнічення процесів біоенергетики та тканинного дихання під впливом олігоєфірів.

Дослідження свідчить, що олігоєфіри в дозі 1/10 LD50 інгібують дихання і окисне фосфорилювання на фоні збільшення частки вільного дихання.

Олігоєфіри в дозі 1/10 LD50 активують в печінці розпад білків, жирів і вуглеводів, надають гепатотоксичної дії, прискорюють вільно радикальні процеси і ПОЛ на фоні інгібування знешкоджуючої, антиоксидантної, біосинтетичної і депонуєвої функції.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб діагностики ендогенної інтоксикації тварин олігоєфірами в експерименті, що включає затравлення експериментальних тварин дозами летальними і сублетальними і вимірювання інтенсивності посиленої H₂O₂ біохемолюмінісценції (БХЛ) сироватки крові через визначені проміжки часу протягом інтервалу часу, побудову за експериментальними даними динамічних кривих БХЛ, порівняння значень інтенсивності БХЛ зі значеннями інтенсивності контрольної групи тварин, який **відрізняється** тим, що додатково проводять дослідження функціонального стану мітохондрій гепатоцитів в процесі розвитку структурно-метаболічного пошкодження тканини печінки, викликаного введенням токсичної дози олігоєфірів 1/10 LD50, визначають швидкість споживання кисню в безакцепторному середовищі (V4), швидкість споживання кисню в присутності акцептора (V3), швидкість споживання кисню після вичерпання додають АДФ (V4), а також розраховують коефіцієнт фосфорилювання - відношення АДФ/O₂, дихальний коефіцієнт (ДК) Ларді, а саме відношення швидкості поглинання кисню у стані V3 до швидкості поглинання кисню у стані V4 (до введення в комірку АДФ); АТФ - активність гідролазних реакцій як відношення V4/V4^P, що характеризує швидкість регенерації АДФ після його фосфорилювання, як субстрат окиснення використовують сукцинат, падіння величин дихального коефіцієнта і

коефіцієнта фосфорилювання дають підставу судити про роз'єднання дихання та окисного фосфорилювання на фоні пригнічення продукції АТФ, що свідчить про ендогенну інтоксикацію.

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

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