



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **103898** (13) **U**
(51) МПК (2015.01)
G01N 33/00
A61B 10/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2015 04908	(72) Винахідник(и): Гунас Ігор Валерійович (UA), Ковальчук Олександр Іванович (UA), Дзевульська Ірина Вікторівна (UA), Черкасов Ельдар Вікторович (UA), Черкасов Віктор Гаврилович (UA)
(22) Дата подання заявки: 20.05.2015	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 12.01.2016	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 12.01.2016, Бюл.№ 1	(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ, бул. Шевченка, 13, м. Київ-4, 01601 (UA)

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ ЕФЕКТИВНОСТІ ЛІКУВАННЯ ОПІКОВОЇ ХВОРОБИ

(57) Реферат:

Спосіб оцінки ефективності лікування опікової хвороби передбачає проведення морфологічних досліджень. Визначають рівень молекул середньої маси та лейкоцитарний індекс інтоксикації до та після лікування лактопротейном з сорбітолом. Одержані результати порівнюють з контролем і при нормалізації показників оцінюють ефективність лікування опікової хвороби.

UA 103898 U

Корисна модель, що заявляється, належить до медицини, точніше до фармакології, і може бути використана для визначення нових властивостей лактопротеїну з сорбітолом при опіковій хворобі.

Глибокі опіки характеризуються не лише пошкодженням покривних тканин, а й викликають різноманітні, тривалі загальні морфологічні й функціональні зміни всіх органів і систем організму (5), які супроводжуються синдромом ендогенної інтоксикації (1,6). У зв'язку з цим, обов'язковою складовою комплексного лікування опікової хвороби клініцисти вважають внутрішньовенну інфузію препаратів дезінтоксикаційної, реологічної, енергетичної та протишокової дії, серед яких лактопротеїн з сорбітолом (лактопротеїн-С) за нашими попередніми даними виявив мембранопластичну дію на структури гістогематичних бар'єрів (2,3,4).

Задачею корисної моделі, що заявляється, є вивчення мембранопластичного ефекту дії лактопротеїну з сорбітолом на структурні зміни аденогіпофіза, кіркової речовини надниркової залози і тимуса при експериментальній опіковій хворобі у щурів.

Поставлена задача вирішується тим, що у відомому способі, який передбачає проведення морфометричних досліджень, згідно з корисною моделлю, визначають рівень молекул середньої маси та лейкоцитарний індекс інтоксикації до та після лікування лактопротеїном з сорбітолом, одержані результати порівнюють з контролем і при нормалізації показників оцінюють ефективність лікування опікової хвороби.

Матеріали та методи. Експериментальне дослідження морфологічних змін в аденогіпофізі, кірковій речовині надниркової залози та тимусі при опіковій хворобі (через 1, 3, 7, 14, 21, 30 діб) та за умов дії інфузійних колоїдногіперосмолярних препаратів дезінтоксикаційної, реологічної, енергетичної, протишокової дії HAES-LX-5 % та лактопротеїну з сорбітолом (4,8) було виконано на 90 щурах-самцях лінії Вістар масою 155-160 грамів.

Утримання та маніпуляції з тваринами проводили у відповідності до "Загальних етичних принципів експериментів на тваринах", ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001), також керувалися рекомендаціями "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей" (Страсбург, 1985) і положеннями "Правил до клінічної оцінки безпеки фармакологічних засобів (GLP)".

Тварини були розділені на 7 груп: I - інтактні тварини; II, III, IV - щури без термічної травми, яким проводилась окрема інфузія 0,9 % розчину NaCl, HAES-LX-5 % та лактопротеїну з сорбітолом (лактопротеїну-С) відповідно у дозі 10 мл/кг; V, VI, VII - тварини з опіком, яким за аналогічною схемою та у такому ж дозовому режимі проводили окреме введення досліджуваних речовин.

Опік (після відповідної премедикації) викликали шляхом прикладання до бічних поверхонь тулуба тварин чотирьох мідних пластинок (по дві пластинки з кожного боку), які попередньо тримали протягом шести хвилин у воді з постійною температурою 100 °C. Загальна площа опіку у щурів зазначеної маси складала 21-23 % при експозиції 10 сек., що є достатнім для формування опіку II ступеня - поверхневого опіку шкіри (колишній III А ступінь) та розвитку шокового стану середнього ступеня тяжкості.

Досліджувані розчини вводили внутрішньовенно протягом 5-6 хв. у дозі 10 мл/кг маси тіла. Інфузію проводили у нижню порожнисту вену, для чого виконували її катетеризацію в асептичних умовах через стегнову вену. Катетер, встановлений у стегновій вені, підшивали під шкіру. Його просвіт по всій довжині заповнювали титрованим розчином гепарину (0,1 мл гепарину на 10 мл 0,9 % розчину NaCl) після кожного введення речовин. Перше введення розчинів здійснювали через 1 годину після моделювання патологічного стану, наступні інфузії виконували щоденно загалом впродовж 7 діб.

Проведені нами попередні дослідження показали, що щури-самці без будь-якої фармакокорекції на фоні опікової травми шкіри гинули всі на 9-у добу експерименту, а на 7-у добу летальність складала 80 %, в зв'язку з чим (враховуючи питання біоетики), практично не можливим було набрати коректну, у кількісному відношенні, групу контролю з чистим опіком шкіри без лікування. Тому задля контролю лікувальної дії гіперосмолярних розчинів ми спиралися на групу тварин, які на фоні опіку шкіри отримували 0,9 % розчин NaCl (ізотонічний розчин).

У групі тварин з опіковою травмою шкіри, яким вводили 0,9 % розчин NaCl, виявлене (табл.) прогресуюче збільшення показника летальності від 5 % через 1-у добу до 11 % у проміжку від 4-ї до 7-ї доби з наступним поступовим зменшенням величини даного показника до 3 % у проміжку від 22-ї до 30-ї доби після опіку шкіри. Загальний показник летальності в групі щурів самців, яким після опіку шкіри вводили 0,9 % розчин NaCl склав 43,5 %. Окрема лікувальна курсова терапія щурів з опіковою травмою шкіри розчином HAES-LX-5 % подібно до такої лактопротеїном-С суттєво перешкоджала загибелі тварин упродовж усього спостереження.

Таблиця

Вплив фармакотерапії 0,9 % розчином NaCl, лактопротейном-С та HAES-LX-5 % на показники летальності щурів з опіковою травмою шкіри

Умови досліджу	Летальність тварин (n- %)					
	Термін спостереження (доба)					
	1	2-3	4-7	8-14	15-21	22-30
Опік + 0,9 % розчин NaCl (n=200)	n=10 (5 %)	n=21 (10,5 %)	n=22 (11 %)	n=17 (8,5 %)*	n=11 (5,5 %)	n=6 (3 %)
Опік + HAES-LX-5 % (n=120)	n=2 (1,7 %)	n=4 (3,3 %)*	n=5 (4,2 %)*	n=4 (3,3 %)#	n=2 (1,7 %)	n=1 (0,8 %)
Опік + лактопротейн-С (n=120)	n=1 (0,8 %)*	n=4 (3,3 %)*	n=3, (2,5 %)*	n=3 (2,5 %)*	n=1 (0,8 %)*	n=3 (1,7 %)

Примітки:

- * - достовірні різниця відносно контролю (опік + 0,9 % NaCl);
- # - тенденція різниці відносно контролю (опік + 0,9 % NaCl).

Ступінь інтоксикації при опіковій хворобі визначали за рівнем молекул середньої маси та ЛІІ, який розраховується за формулою Я. Кальф-Каліфа:

$$ЛІІ = ((4М+3Ю+2П+С)х(Пл+1))/((Л+Мо)х(Е+1)),$$

де М - мієлоцити, Ю - юні, П - паличкоядерні, С - сегментоядерні нейтрофіли, Пл - плазмоцити, Л - лімфоцити, Мо - моноцити, Е - еозинофіли.

Дослідження ступеня інтоксикації проводили в проблемній науково-дослідній лабораторії функціональної морфології та генетики розвитку науково-дослідного центру Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова, сертифікованої ДФЦ МОЗ України (посвідчення №003/10 від 11.01.2010 р).

Статистичний аналіз результатів дослідження провели в пакеті STATISTICA 5.5 (належить ЦНІТ ВНМУ імені М.І. Пирогова. Ліцензійний № AXXR910A374605FA) з використанням непараметричних методів оцінки отриманих результатів. Оцінювали правильність розподілу ознак за кожним з отриманих варіаційних рядів, середні значення за кожною ознакою, що вивчалися та стандартні відхилення. Достовірність різниці значень між незалежними кількісними величинами визначали за допомогою U-критерію Мана-Уїтні.

Забір матеріалу проводився під наркозом. У тварин після декапітації робили розтин порожнини черепа, черевної та грудної порожнини і вирізали за допомогою леза невеликі шматочки аденогіпофіза, кіркової речовини надниркової залози, тимуса. Матеріал для морфологічних досліджень обробляли за загальноприйнятою методикою.

Ультратонкі зрізи готували на ультрамікротомі LKB, вивчали та фотографували на електронному мікроскопі ПЕМ-125К. Напівтонкі зрізи забарвлювали толудіновим та метиленовим синім. Гістологічні зрізи (одержані з парафінових блоків) забарвлювали гематоксилін-пікрофуксином та гематоксилін-еозином. Морфометричне дослідження гістологічних препаратів було проведене із використанням мікроскопа OlympusBX51. Отримані результати статистично обробляли з використанням t-критерію Стюдента.

Електронно-мікроскопічне дослідження виконано на базі відділу електронної мікроскопії (науковий керівник - професор Л.О. Стеченко) Інституту проблем патології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця.

Динаміка показників ступеня інтоксикації свідчать, що рівень молекул середньої маси та лейкоцитарного індексу інтоксикації (ЛІІ), статистично значуще нижчий у щурів без опіку, ніж у щурів з опіком протягом всього експерименту. Досліджувані показники статистично значуще вищі у щурів, яким вводили 0,9 % розчин NaCl в порівнянні з тваринами, яким проводили окрему інфузію лактопротейну-С та HAES-LX-5 %. Найвищі показники рівня молекул середньої маси у щурів з опіком зафіксовані через 3 доби після опіку, відповідає періоду гострого опікового шоку. Найменший рівень молекул середньої маси у щурів з опіком встановленим через 30 діб після травми. Рівень ЛІІ досягав свого максимуму у щурів з опіком, яким вводили лактопротейн-С та HAES-LX-5 % через 3 доби.

Для аденогіпофіза, кіркової речовини надниркової залози і тимуса щурів з опіковою травмою шкіри, яким вводили 0,9 % розчин NaCl, через 1, 3, 7 та 14 діб експерименту (терміни, коли зареєстроване збільшення та стабілізація величини показників летальності та ендогенної

інтоксикації) найбільш характерним загальним проявом патоморфологічних змін був некроз функціонально різних клітин органів. У цей період у стінці кровоносних капілярів і венул спостерігається набряк ендотеліоцитів, їх парціальний і тотальний некроз, відбувається потоншення та локальна руйнація базальної мембрани, утворюються паравазальні

5 крововиливи. В стінці кровоносних капілярів зі збереженою судинною стінкою ендотеліальне покриття стає тонким, в ділянках простих за формою і невеликих за довжиною міждотеліальних контактів з'являються розширені міждотеліальні щілини або трансдотеліальні канали [9], які в зонах відповідних до них локусів руйнації базальної мембрани мають вигляд наскрізних трансмуральних дефектів (Рис. 1). Описані трансмуральні дефекти разом з прилеглими і

10 розширеними (у результаті розвитку набряку) міжклітинними просторами вивчених органів є місцями "протікання" і внутрішньоорганного "проникнення" плазми та клітин крові, що призводить до прогресування набряку та крововиливів.

У щурів з опіковою травмою, яким за схемою експерименту були введені гіперосмолярні розчини (VI та VII групи тварин), у досліджених органах нейроімуноендокринної системи не виявлені суттєві пошкодження стінки кровоносних судин та крововиливи, а також, відповідно, не зареєстровані структурні ознаки паравазального та міжклітинного набряку. Це свідчить про

15 ангіопротекторні властивості застосованих комбінованих гіперосмолярних розчинів, які за умов застосування лактопротейну з сорбітолом пов'язані з доволі специфічною мембранопластичною дією цього препарату.

Через 3 доби і, особливо, через 7 діб в досліджених органах тварин з опіковою травмою, яким був введений лактопротейн-С (VII експериментальна група), навколо кровоносних судин та в зоні базальної мембрани судинної стінки відзначено нерівномірне накопичення гетероморфного електроннощільного матеріалу (складається з неоднаково розподілених в

20 аморфному матриксі дрібних фібрил та гранул). Загальна електронна щільність цього матеріалу є меншою ніж щільність матриксу еритроцитів у судинному просвіті. Цей матеріал на електронограмах відрізняється від розташованого у судинному просвіті лактопротейну-С, який візуально є гомогенним і аморфним.

Паравазальний характер розташування зазначеного електроннощільного матеріалу свідчить, що його поява пов'язана з специфікою транспорту складових лактопротейну-С після

30 опікової травми через "протікання" судинної стінки, які вони чітко декорують. Складові лактопротейну-С, що потрапили у судинну стінку та розповсюдились через "проникнення" (Рис. 2, 3) паравазально, модифікуються за рахунок фагоцитозу та синтезуючої діяльності прилеглих клітин з утворенням специфічного внутрішньоорганного мембрано подібного комплексу (Рис. 4).

Просторово-часові параметри формування виявлених мембраноподібних структур, свідчать

35 що вони є проявом довготривалої адаптації [7]. Окремі описані специфічні мембраноподібні структури об'єднуються у комірки і відокремлюють кластери клітин, які заміщують решту загинувших за рахунок некрозу та апоптозу [10] клітин. Через 14, 21 та 30 діб експерименту специфічні мембраноподібні структури в судинній стінці та в паренхімі досліджених органів утворюють розгалужений мембраноподібний комплекс, в комірках якого локалізовані клітини,

40 що мають типові ознаки морфологічної норми.

Лактопротейн-С в умовах появи зон "протікання" та "проникнення" в аденогіпофізі, кірковій речовині надниркової залози і тимусі при опіковій хворобі не обмежується дезінтоксикаційною, реологічною та протишоковою діями його власне інфузійного впливу, але й проявляється

45 виразним замісним мембранопластичним ефектом.

Загальним проявом морфологічних змін в аденогіпофізі, кірковій речовині надниркової залози та тимусі при опіковій хворобі є некроз і апоптоз функціонально різних клітин органів та стінок судин гемомікроциркуляторного русла на тлі утворення крововиливів, виразного

50 паравазального та міжклітинного набряку. Провідним фактором розвитку набряку в досліджених органах при опіковій хворобі є широкий діапазон морфофункціональних змін судинного ендотелію, які призводять до утворення наскрізних трансмуральних дефектів у стінці кровоносних судин ("протікань") і відповідних внутрішньоорганих міжклітинних розширень ("проникнень"), маркером яких є електроннощільний лактопротейн-С.

Лактопротейн-С та HAES-LX-5 % за умов розвитку опікової хвороби проявляють адаптогенні (цито- та ангіопротекторні) властивості, гальмують розвиток крововиливів, набряку,

55 попереджають альтерацію клітин аденогіпофіза кіркової речовини надниркової залози і тимуса та сприяють репарації органів. Лактопротейн-С за умов розвитку опікової хвороби проявляє структурозамісні мембранопластичні властивості, що полягають в утворенні системи взаємозв'язаних мембраноподібних структур.

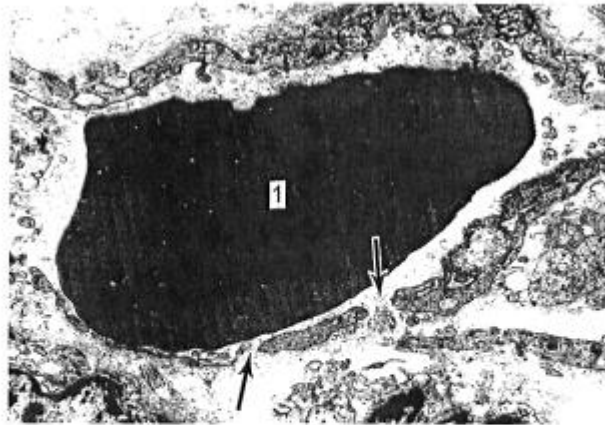
На базі інституту проблем патології Національного медичного університету був апробований спосіб, що заявляється. Отримані позитивні результати дозволяють рекомендувати його для широкого використання в клінічну практику.

Джерела інформації:

- 5 1. Афанасьева А.Н. Синдром эндогенной интоксикации и системного воспалительного ответа: общность и различия / А.Н. Афанасьева, И.Н. Одинцова, В.В. Удут // Анестезиология и реанимация. - 2007. - № 4 - С. 67-71.
2. Гунас І.В. Динаміка змін ендогенної інтоксикації в організмі щурів протягом місяця після опіку шкіри II-III ступеня, площею 21-23 % поверхні тіла та її корекція інфузійними розчинами лактопротейну з сорбітолом та НАЕС-LX-5 % / І.В. Гунас, Б.О. Кондрацький, І.К. Нурметова [та ін.] // Український морфологічний альманах. - 2012. - ТЛО, № 4. - С 29-34.
- 10 3. Дзевульська І.В. Морфологическая характеристика гистогематических барьеров в органах нейроиммунорендокринной системы при инфузионной терапии ожоговой болезни комбинированными гиперосмолярными растворами / И.В. Дзевульская, И.В. Гунас, Э.В. Черкасов [и др.] // Хирургия. Восточная Европа.-2014. - №2 (10). - С. 113-124.
- 15 4. Ковальчук О.І. Механізми структурної трансформації гістогематичних бар'єрів органів нейроімунорендокринної системи за умов інфузійної терапії опікової хвороби / О.І. Ковальчук, І.В. Дзевульська, Е.В. Черкасов [та ін.] // Клінічна анатомія та оперативна хірургія. - 2014. - Т. 13, № 2. - С. 69-74.
- 20 5. Козинець Г.П. Опікова хвороба та її наслідки / Г.П. Козинець, С.В. Слесаренко, О.М. Сорокіна [та ін.] // Дніпропетровськ: Преса України, 2008. - 224 с.
6. Меерсон Ф.З. Адапционная медицина: концепция долговременной адаптации / Ф.З. Меерсон. - М.: Дело, 1993. - 138 с.
7. Межирова Н.М. Патологические и диагностические аспекты синдрома системного воспалительного ответа / Н.М. Межирова, В.В. Данилова, С.С. Овчаренко // Медицина неотложных состояний. - 2011. - № 1-2. - С. 32-39.
- 25 8. Ушакова Т.А. Роль изучения процесса адаптации на ожоговую травму / Т.А. Ушакова // Комбустиология. - 2004. - № 18-19. - С. 29-37.
9. Aird W.C. Spatial and temporal dynamics of the endothelium / W.C. Aird // Thromb.Hemost. - 2005. - Vol. 3, № 7. - P. 1392-1406.
- 30 10. Kroemer G. Classification of cell death: recommendation of the Nomenclature Committee on Cell Death / G. Kroemer, L. Galluzzi, P. Vandenabeele [et al.] // Cell Death Differ. - 2009. - Vol. 16.- P. 1-3.

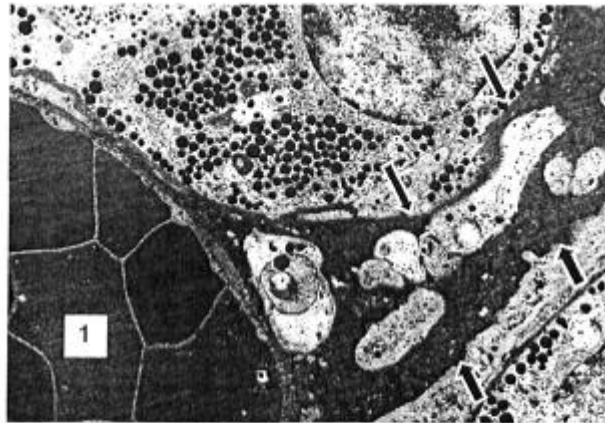
35 ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб оцінки ефективності лікування опікової хвороби, що передбачає проведення морфологічних досліджень, який **відрізняється** тим, що визначають рівень молекул середньої маси та лейкоцитарний індекс інтоксикації до та після лікування лактопротейном з сорбітолом, одержані результати порівнюють з контролем і при нормалізації показників оцінюють ефективність лікування опікової хвороби.



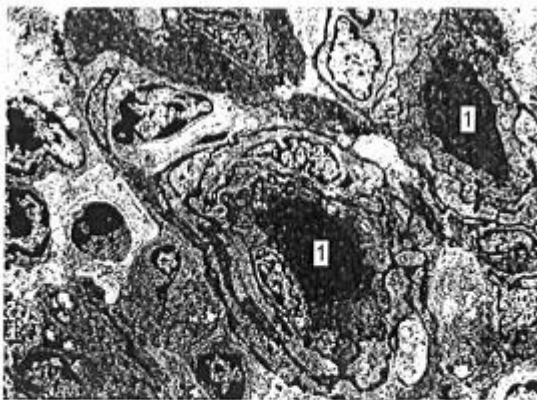
Утворення наскрізних дефектів (трансендотеліальних каналів та відповідних до них локусів зникнення базальної мембрани) в стінці кровоносного капіляра тимуса щура через 7 діб розвитку опікової хвороби за умов введення 0,9% розчину NaCl. Стрілочками відмічені наскрізні дефекти кровоносного капіляра. 1– еритроцит у просвіті кровоносного капіляра. Зб. 15000.

Fig.1



Електроннощільне «проникнення» (відмічено стрілочками) в міжклітинному інтерстиційному матриксі аденогіпофіза щура через 3 доби розвитку опікової хвороби при умові введення лактопротеїну-С. 1 – еритроцити в просвіті кровоносного капіляра. Зб. 9800.

Fig.2



Електроннощільний вміст у просвіті кровоносних капілярів (1), що «декорує» розширені міжклітинні щілини судинної стінки і ніби «розливається» навколо судин тимуса щура через 7 днів розвитку опікової хвороби за умов введення лактопротеїну-С. Зб. 6000.

Fig.3



Специфічний внутрішньоорганний мембраноподібний комплекс (відмечений стрілочками) в аденогіпофізі щура на 14 добу розвитку опікової хвороби за умови введення лактопротеїну-С. Зб. 8600.

Fig.4

Комп'ютерна верстка Д. Шеверун

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

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