УКРАЇНА

(19) UA (11) 114453 (13) C2

(51) МПК
G01N 33/50 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ЕКОНОМІЧНОГО РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **a 2016 00828**

(22) Дата подання заявки: **02.02.2016**

(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **12.06.2017**

(41) Публікація відомостей про заявку: **12.09.2016, Бюл.№ 17**

(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **12.06.2017, Бюл.№ 11**

(72) Винахідник(и):
Андросов Євген Дмитрович (UA),
Комаревцева Ірина Олександрівна (UA),
Комаревцев Віталій Миколайович (UA),
Шипілова Інна Володимирівна (UA),
Комаревцева Катерина Віталіївна (UA),
Жерновая Марина Євгеніївна (UA)

(73) Власник(и):
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ,
пр. Леніна, 4, м. Харків, 61022 (UA)

(74) Представник:
Євтушенко Тамара Григорівна

(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
Лукьянова Л.Д. Молекулярные механизмы тканевой гипоксии и адаптации организма / Л.Д. Лукьянова // Фізіологічний журнал. - 2003. - Т. 49, № 3. - С. 17-35
Біохімічні особливості ішемії нижньої кінцівки при введенні алогенних мезенхімальних стовбурових клітин в експерименті: автореф. дис. канд. мед. наук/ І.В. Шипілова; Луган. держ. мед. ун-т. - Луганськ, 2009. - 28 с.
Динамика содержания лактатдегидрогеназы и креатинкиназы в сыворотке крови при ишемии нижней конечности на фоне применения аллогенных мезенхимальных стволових клеток / Шипилова И.В.// Український журнал екстремальної медицини імені Г.О. Можаєва. - 2008. - № 3. - С. 98-101
UA 96710 C2, 25.11.2011

UA 114453 C2

(54) СПОСІБ ВИЯВЛЕННЯ ПОЧАТКУ ПОРУШЕНЬ ЕНЕРГЕТИЧНОГО ОБМІНУ В ІШЕМІЗОВАНІЙ М'ЯЗОВІЙ ТКАНИНІ

(57) Реферат:

Винахід належить до галузі медицини, а саме до лабораторної діагностики, та стосується способу виявлення початку порушень енергетичного обміну в ішемізованій м'язовій тканині, який включає визначення у сироватці крові активності креатинфосфокінази (КФК) та в м'язовій тканині експериментальної тварини вмісту аденозинтрифосфату (АТФ) на 3-ю добу після лігування й подальшого перерізу стегнової артерії щурів, а також порівняння одержаних вимірів з контролем, причому у сироватці крові дослідної тварини додатково визначають активність лактатдегідрогенази (ЛДГ), і при зниженні вмісту АТФ у межах 2714,2±25,84 мкмоль/кг, зниженні активності КФК у межах 2194,05±42,38 МО/л і збільшенні активності ЛДГ у межах 714,27±6,98 МО/л констатують початок порушень енергетичного обміну в м'язовій тканині останніх.

Винахід належить до галузі медицини, а саме до лабораторної діагностики, і може бути використаний для поліпшення результатів виявлення початкових проявів порушення енергетичного обміну при ішемії м'язів.

Актуальність предмету винаходу пов'язана з суттєвим підвищенням частоти розвитку оклюзійних захворювань судин у людей, особливо нижніх кінцівок, що призводить до необхідності у високій ампутації, зниження якості їх життя й значної загальної смертності. Останнє пов'язано, насамперед, з недостатньо своєчасною діагностикою цієї патології. У той же час, ще мало даних про біохімічні особливості енергетичного обміну в ішемізованій м'язовій тканині. Тому вельми важливими є спроби виявлення нових, патогенетично значущих тестів початку порушень енергетичного обміну, зокрема при ішемії нижніх кінцівок (ІНК).

Відомий спосіб виявлення порушень енергетичного обміну в ішемізованій тканині, який передбачає дослідження в ній активності процесів вільнорадикального окислення [Лукьянова Л.Д. Молекулярные механизмы тканевой гипоксии и адаптации организма / Л.Д. Лукьянова // Фізіологічний журнал. - 2003. - Т. 49, № 3. - С. 17-35].

Однак активація вільнорадикальних процесів спостерігається вже під час термінальної стадії енергетичних порушень і тому вказаний спосіб не дозволяє оцінювати саме ранній розвиток змін останніх.

Існує також спосіб виявлення порушень енергетичного обміну в ішемізованій тканині, що включає дослідження стану процесу перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) за рівнем у плазмі крові його первинних і вторинних продуктів - дієнових кон'югатів і малонового діальдегіду [Телкова И.Л. Клинические и патофизиологические аспекты влияния хронической гипоксии/ишемии на энергетический метаболизм миокарда / И.Л.Телкова, А.Т.Тепляков // Клиническая медицина. - 2004. - № 3. - С. 4-11].

Але посилення процесів ПОЛ має місце теж уже в термінальній стадії енергетичних порушень. Крім того, цей спосіб має обмежену інформативність у зв'язку з тим, що зміни величин продуктів ПОЛ у відповідь на будь-яку патологію є універсальною біологічною реакцією, яка безумовно не є специфічною для м'язової тканини.

Тому був запропонований спосіб виявлення порушень енергетичного обміну в ішемізованій тканині шляхом виявлення в ній концентрації аденозинтрифосфату (АТФ), зміни вмісту якого корелюють з мітохондріальними порушеннями, що виникають при ішемії й передують змінам інших функціонально-метаболічних параметрів, які контролюють життєдіяльність клітин, а також визначення активності креатинфосфокінази (КФК), одного з основних ферментів, які характеризують ішемічне пошкодження скелетної мускулатури [Brar B. Urocortin protection of cardiac myocytes from lethal ischemia is mediated by Markinase / B. Brar, A. Jonassen, A. Stephanou // European Heart Journal. - 1999. - № 20. - P. 20-24].

Даний спосіб виявлення початку порушень енергетичного обміну в ішемізованій м'язовій тканині є найбільш близьким до того, що заявляється, за технічною суттю і результатом, який може бути досягнутим, тому його вибрано за прототип.

До недоліків способу-прототипу належить те, що він, хоча й передбачає виявлення показників, характерних для початкової стадії біоенергетичної гіпоксії, але не самих інформативних і загальноприйнятих.

В основу винаходу поставлено задачу підвищення ефективності відомого способу виявлення порушень енергетичного обміну в ішемізованій тканині, а саме використання показників, що найбільш суттєво й вірогідно змінюються в сироватці крові вже при початкових порушеннях цього обміну, що створює умови для застосування способу й в клініці.

Задачу, яку поставлено в основу винаходу, вирішують тим, що у відомому способі виявлення початку порушень енергетичного обміну в ішемізованій м'язовій тканині, який включає визначення у сироватці крові активності креатинфосфокінази (КФК) та в м'язовій тканині експериментальної тварини вмісту аденозинтрифосфату (АТФ) на 3-ю добу після лігування й подальшого перерізу стегнової артерії щурів, а також порівняння одержаних вимірів з контролем, згідно з винаходом, у сироватці крові дослідної тварини додатково визначають активність лактатдегідрогенази (ЛДГ), і при зниженні вмісту АТФ у межах 2714,2±25,84 мкмоль/кг, зниженні активності КФК у межах 2194,05±42,38 МО/л і збільшенні активності ЛДГ у межах 714,27±6,98 МО/л констатують початок порушень енергетичного обміну в м'язовій тканині останніх.

Технічний ефект винаходу, а саме підвищення ефективності відомого способу виявлення порушень енергетичного обміну в ішемізованій тканині, а саме використання показників, що найбільш суттєво й вірогідно змінюються в сироватці крові вже при початкових порушеннях цього обміну, що створює умови для застосування способу й в клініці, обумовлений синергізмом заходів та засобів, які заявляються.

Наша пропозиція щодо визначення вмісту АТф в м'язовій тканині експериментальної тварини, а також активності КФК і ЛДГ у сироватці крові хворих і щурів з метою виявлення початкових проявів порушень енергетичного обміну в ішемізованих м'язових тканинах базується на вперше встановленій авторами заявленого способу в експериментальних умовах і в подальшому підтвердженій в клініці закономірності, яка полягає в тому, що вже для першої стадії біоенергетичної гіпоксії характерне не тільки зниження вмісту АТФ у самих ішемізованих м'язових тканинах експериментальних тварин, а й суттєве падіння активності КФК, а також підвищення такої ЛДГ у сироватці крові щурів і хворих, що дозволяє використовувати ці показники не тільки в експериментальних дослідженнях, а й в клініці як додаткові об'єктивні біохімічні маркери ранніх порушень досліджуваного обміну. Раніше запропоновані показники як критерії оцінки початкових порушень енергетичного обміну в ішемізованій м'язовій тканині не використовувалися.

Заявлений спосіб здійснюють таким чином. Визначають у сироватці крові експериментальної тварини активність креатинфосфокінази (КФК) та в м'язовій тканині - вміст аденозинтрифосфату (АТФ) на 3-ю добу після лігування й подальшого перерізу стегнової артерії щурів, а також порівнюють одержані виміри з контролем. У сироватці крові дослідної тварини додатково визначають активність лактатдегідрогенази (ЛДГ). При зниженні вмісту АТФ у межах 2714,2±25,84 мкмоль/кг, зниженні активності КФК у межах 2194,05±42,38 МО/л і збільшенні активності ЛДГ у межах 714,27±6,98 МО/л констатують початок порушень енергетичного обміну в м'язовій тканині останніх.

Ефективність способу підтверджена експериментально.

Експериментальне моделювання ІНК проводили на 36 білих безпородних статевозрілих щурах-самцях масою 160-200 г шляхом лігування з подальшим перерізом стегнової артерії під тіопенталовим наркозом. Матеріал для дослідження (сироватка крові й м'язова тканина) забирали через 3, 5, 7, 14, 21 і 28 діб після початку експерименту. Для дослідження брали литковий м'яз оперованої кінцівки. 20 % й 10 % гомогенати готували на охолодженому лізис-буфері (Тритон Х-100, Трис-НСІ, ЕДТА) і сахарозному середовищі виділення (сахароза, ЕДТА). Визначення концентрації АТФ у м'язовій тканині проводили методом тонкошарової хроматографії на сілікагелевих пластинах фірми "Силуфор" (Росія), а активності КФК і ЛДГ у сироватці крові хворих і щурів - загальноприйнятими методами. При цьому забір крові для досліджування у хворих з підозрою на ІНК здійснювався в день їх надходження до стаціонару.

Результати порушень енергетичного обміну на підставі даних вмісту АТФ у м'язовій тканині при експериментальній ІНК представлені в таблиці 1.

Таблиця 1

Вміст АТФ у м'язовій тканині щурів з ІНК (мкмоль/кг)

Показник	Група спостереження	Доба спостереження					
		3	5	7	14	21	28
АТФ	Інтактна	7108,78±24,56					
	з ІНК	2714,2±25,84*	2864,3±59,79*	3297,3±46,33*	4109,4±26,52*	4015,5±18,01*	5479,8±45,9*

Примітка: у табл. 1-3 * - показники вірогідні відносно інтактної групи ($p<0,05$).

Із таблиці 1 видно, що вже на 3-ю добу експерименту вміст АТФ у м'язовій тканині тварин з ІНК був на 61,8 % нижчим, ніж в інтактній групі ($p<0,05$), що могло бути пов'язано з переходом енергетичного метаболізму клітин на анаеробний шлях утворення енергії, значним сповільненням ресинтезу АТФ із АДФ та АМФ. При цьому можливим джерелом утворення основного макроергу при даному стані могло бути субстратне фосфорилювання. На 5-у добу спостереження вірогідних відмінностей в порівнянні з 3-ю добою не відмічалось (менше на 59,7 %). До кінця першого тижня рівень АТФ підвищувався на 8,2 %, але в порівнянні з інтактними щурами залишався на 53,6 % нижче. У наступні строки дослідження відмічалася тенденція до збільшення вмісту АТФ, однак у порівнянні з інтактними тваринами він залишався вірогідно нижчим (на 42,2 %, 43,5 % й 22,9 % відповідно; $p<0,05$). Деяке підвищення рівня АТФ в ішемізованій м'язовій тканині нижніх кінцівок щурів можна пов'язувати з розвитком адаптаційно-компенсаторних реакцій, частковим розвитком колатерального кровообігу й можливим переходом на окислювальний механізм синтезу макроергів.

У процесі дослідження було також встановлено, що ІНК дослідних тварин супроводжується не менш суттєвими й вірогідними зсувами активності в сироватці крові ферментів, які є органоспецифічними для м'язової тканини.

Так, уже на 3-ю добу експерименту активність КФК максимально зменшувалася (на 45,9 %) і залишалася вірогідно й суттєво (на 41,8 % й на 42,9 % на 5-у й 7-у добу відповідно) низькою до кінця першого тижня спостереження (табл. 2). Протягом другого тижня спостерігалася тенденція до збільшення активності ферменту, хоча вона ще була вірогідно нижчою (на 29,8 %) у порівнянні з інтактною групою. На 21-у добу активність КФК не тільки досягала значень інтактної групи, але й перевищувала їх на 31,3 % й нормалізувалася на кінець дослідження.

Таблиця 2

Динаміка активності КФК у сироватці крові щурів з ІНК (МО/л)

Показник	Група спостереження	Доба спостереження					
		3	5	7	14	21	28
КФК	Інтактна	4053,59±37,44					
	з ІНК	2194,05±42,33*	2357,4±115,9*	2314,86±77,66*	2846,95±132,6*	5323,74±256,93*	4095,11±167,78

Що стосується динаміки активності ЛДГ, то остання максимально й вірогідно збільшувалася (на 31,25 %) уже на 3-ю добу експерименту, що могло свідчити про підвищення функціонування реакцій анаеробного гліколізу, як наслідок розвитку ранніх адаптаційних механізмів, практично не відрізнялася від даних інтактної групи до кінця першого тижня спостереження (була на 1,9 % й на 8,6 % вище на 5-у й 7-у добу відповідно) і знов ставала вірогідно підвищеною в усі наступні строки дослідження (на 13,3 %, 29,7 % й 25,2 % вище на 14-у, 21-у й 28-у добу відповідно), як наслідок розвитку пізніх адаптаційних механізмів (табл. 3).

Таблиця 3

Динаміка активності ЛДГ у сироватці крові щурів з ІНК (МО/л)

Показник	Група спостереження	Доба спостереження					
		3	5	7	14	21	28
ЛДГ	Інтактна	544,21±1,68					
	з ІНК	714,27±6,98*	554,74±6,22	590,91±20,89	616,36±19,99*	706,09±11,06*	681,42±11,76*

Отже, зсуви активності запропонованих ферментів повністю віддзеркалюють ті порушення енергетичного обміну, що мають місце безпосередньо в ішемізованій м'язовій тканині нижніх кінцівок експериментальних тварин, а тому можуть слугувати об'єктивними біохімічними критеріями появи цих змін у хворих чи експериментальних тварин лише за аналізом їх крові.

Таким чином, отримані дані свідчать про ефективність і перспективність заявленого способу виявлення початку порушень енергетичного обміну в ішемізованій м'язовій тканині в умовах як лабораторної практики, так і клініки. Заявлений спосіб доступний для застосування, не потребує дорогого чи дефіцитного обладнання й реактивів, корисний і для практичної медицини, а тому може бути рекомендований для поширеного використання в лабораторній та клінічній практиці.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Спосіб виявлення початку порушень енергетичного обміну в ішемізованій м'язовій тканині, який включає визначення у сироватці крові активності креатинфосфокінази (КФК) та в м'язовій тканині експериментальної тварини вмісту аденозинтрифосфату (АТФ) на 3-ю добу після лігування й подальшого перерізу стегнової артерії щурів, а також порівняння одержаних вимірів з контролем, який **відрізняється** тим, що у сироватці крові дослідної тварини додатково визначають активність лактатдегідрогенази (ЛДГ), і при зниженні вмісту АТФ у межах 2714,2±25,84 мкмоль/кг, зниженні активності КФК у межах 2194,05±42,38 МО/л і збільшенні активності ЛДГ у межах 714,27±6,98 МО/л констатують початок порушень енергетичного обміну в м'язовій тканині останніх.

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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