



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Статус: не действует (последнее изменение статуса: 02.07.2021)
Пошлина: Возможность восстановления: нет.

(21)(22) Заявка: [2012147171/15](#), 06.11.2012(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
06.11.2012

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 06.11.2012

(43) Дата публикации заявки: 20.05.2014 Бюл. № 14

(45) Опубликовано: 10.09.2014 Бюл. № 25

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске:

RU 2413952 C2 (ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ "СИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ФЕДЕРАЛЬНОГО АГЕНТСТВА ПО ЗДРАВООХРАНЕНИЮ И СОЦИАЛЬНОМУ РАЗВИТИЮ") 10.03.2011
RU 2439580 C1 (ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ "НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ") 10.01.2012 HIRODE M. et al. Gene expression profiling in rat liver treated with various hepatotoxic-compounds inducing coagulopathy. J Toxicol Sci. 2009 Jun;34(3):281-93. [PubMed Найдено в БДб PMID: 19483382 БЛИЗНЕЦОВА Г. Н. Пероксидное окисление липидов, антиоксидантная система и оксид азота при токсическом повреждении печени. Автореф. дисс. д.б.н., Воронеж, 2004

Адрес для переписки:

634050, г.Томск, пр. Ленина, 30, Национальный исследовательский Томский политехнический университет, отдел правовой охраны результатов интеллектуальной деятельности

(72) Автор(ы):

Канская Наталья Викторовна (RU),
Иванов Владимир Владимирович (RU),
Федорова Татьяна Сергеевна (RU),
Федорова Нина Александровна (RU),
Степовая Елена Алексеевна (RU),
Серебров Владимир Юрьевич (RU),
Акбашева Ольга Евгеньевна (RU),
Романова Наталия Викторовна (RU),
Позднякова Ирина Анатольевна (RU),
Башкова Ирина Борисовна (RU),
Канский Александр Викторович (RU),
Твердохлебов Сергей Иванович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Национальный исследовательский Томский политехнический университет" (RU),
Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Сибирский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU),
Федеральное государственное бюджетное учреждение "Научно-исследовательский институт кардиологии" СО РАМН (RU)

(54) СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ ОСТРОГО ТОКСИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ПЕЧЕНИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине и касается диагностики острого токсического повреждения печени крыс. Способ заключается в выделении липидов, а именно в том, что добавляют 25 мкг 10% раствора тезита при одновременном перемешивании смеси с помощью шейкера при 20°C и частоте колебаний 120 в минуту в течение 30 минут с последующим определением в растворе общих фосфолипидов и триглицеридов. При их соотношении, равном 1,01-1,19, при росте активности в крови аланинаминотрансферазы 0,50-0,62 ммоль/л и более диагностируют острое токсическое повреждение печени крыс. Использование способа позволяет повысить эффективность и точность диагностики острого токсического повреждения печени крыс. 2 табл.

Известны способы диагностики острого токсического повреждения печени крыс методом экстракции с последующей тонкослойной хроматографией (Практикум по биохимии. С.Е. Северин, Т.А. Соловьева, Москва, МГУ, 1989, 509 с). Для частичной делипидизации липопротеинов крови используется в низких концентрациях (0,1%) неионный детергент Тритон X-100 (патенты RU 2413952 C1 от 10.03.2011 и RU 2428668

С1 от 10.09.2011 «Способ определения фракций модифицированных липопротеинов крови»; RU 2439580 С1 от 10.01.2012 «Способ определения фракций липопротеинов крови у больных ишемической болезнью сердца»; RU 2439575 С1 от 10.01.2012 и RU 2439581 С1 от 10.01.2012 «Способ оценки эффективности лечения ишемической болезни сердца»; RU 2439576 С1 от 10.01.2012 и RU 2439582 С1 от 10.01.2012 «Способ прогнозирования течения ишемической болезни сердца»)

Известен так же способ выделения липидов по методу Фолча (Практикум по биохимии. С.Е. Северин, Т.А. Соловьева, Москва, МГУ, 1989, 509 с). Данный способ является наиболее близким к предлагаемому по технической сущности и достигаемому результату и выбран в качестве прототипа.

Недостатком данного способа является невозможность его использования для анализа конечного результата, а именно определения ферментативным методом концентрации триглицеридов в печени крыс.

Целью предлагаемого изобретения является повышение эффективности и точности способа.

Указанная цель достигается дополнительным добавлением к хлороформному экстракту липидов 25 мкл 10% раствора тезита при одновременном перемешивании смеси с помощью шейкера при 20°C и частоте колебаний 120 в минуту в течение 30 минут с последующим определением в общих фосфолипидов и триглицеридов и при их соотношении, равном 1,01-1,19, при росте активности в крови аланинаминотрансферазы 0,50-0,62 ммоль/л и более диагностируют острое токсическое повреждение печени крыс.

Новым в данном способе является получение прозрачного раствора липидов для ферментативной оценки уровня общих фосфолипидов, триглицеридов для диагностики острого токсического повреждения печени. Это достигается путем добавления к хлороформному экстракту липидов 25 мкл 10% раствора тезита при одновременном перемешивании смеси с помощью шейкера при 20°C и частоте колебаний 120 в минуту в течение 30 минут и получением прозрачного раствора липидов, в котором определяют общие фосфолипиды и триглицериды и при их соотношении, равном 1,01-1,19, при росте активности в крови аланинаминотрансферазы 0,50-0,62 ммоль/л и более диагностируют острое токсическое повреждение печени крыс.

Следовательно, только комплексная модернизация способа прототипа позволяет получить желаемый результат.

Использование различных детергентов в эксперименте при изучении ишемической болезни сердца и развитии липидемии рекомендовано Всероссийским научным обществом кардиологов согласно положению рекомендаций Европейского общества по изучению атеросклероза «Диагностика и коррекция нарушений липидного обмена с целью профилактики и лечения атеросклероза» (г. Москва, 2005; Клиническая лабораторная диагностика, №10, 2008, с.21-32).

В настоящее время перспективными являются методы исследования липидов с неионными детергентам Тритон-Х100 и тезит (Polidocanol) для солюбилизации гидрофобных белков, липополисахаридов и других гидрофобных молекул. Наиболее часто используется Тритон-Х100. Его химическая формула $C_{14}H_{220}(C_2H_{40})_n$, где $n=10$. Это полиоксиэтилен-октил-фениловый эфир или полиэтиленгликоль n (1,1,3,3 тетраметил-бутил-фениловый эфир с достаточно большой молекулярной массой). В настоящее время этот высокомолекулярный детергент заменяется на низкомолекулярный тезит (Polidocanol) с молекулярной формулой $C_{30}H_{62}O_{10}$ и молекулярной массой 582,81 г/моль. По химическому строению это гидроксиполиэтоксидодекан (Laugomacrogol 400). Применение 25 мкл 10% раствора тезита, добавленного к хлороформному липидному экстракту при одновременном перемешивании смеси при 20°C и частоте колебаний шейкера 120 в минуту в течение 30 минут, позволяет получить прозрачный раствор липидов для ферментативного определения триглицеридов. Поэтому для повышения точности способа экспериментальным путем была выбрана концентрация тезита 10% в объеме 25 мкл, позволяющая получить абсолютно прозрачный раствор липидов для дальнейшего исследования (табл.1). Меньшая концентрация тезита не позволяла получить абсолютно прозрачный раствор, а большая концентрация тезита не являлась оптимальной для проведения дальнейших ферментативных исследований липидов (триглицеридов, холестерина и др.). Одновременное добавление раствора тезита к хлороформному экстракту липидов, перемешивание смеси при 20°C и частоте колебаний шейкера 120 в минуту в течение 30 минут позволяет повысить эффективность и точность способа и при соотношении общих фосфолипидов и триглицеридов, равных 1,19 и менее, при росте активности в крови аланинаминотрансферазы (АЛАТ) с 0,25 до 0,50 ммоль/л и более диагностируют острое токсическое повреждение печени. Следовательно, указанный биохимический комплекс анализов позволил получить желаемый результат.

Предлагаемый способ позволяет получить абсолютно прозрачный хлороформный

экстракт липидов для дальнейшего ферментативного определения триглицеридов, общих фосфолипидов печени крыс.

Каждый вновь введенный в формулу изобретения признак выполняет функцию повышения точности и эффективности способа: добавление к хлороформному экстракту липидов 25 мкл 10% раствора тезита, одновременное перемешивание смеси при 20°C и частоте колебаний шейкера 120 в минуту в течение 30 минут и получение прозрачного раствора липидов, в котором определяют общие фосфолипиды и триглицериды и при их соотношении, равном 1,01-1,19, при росте активности в крови аланинаминотрансферазы 0,50-0,62 ммоль/л и более диагностируют острое токсическое повреждение печени.

В химической промышленности используются различные детергенты (при изготовлении стирального порошка, моющих средств и т.д.), но при работе с биологическим материалом используется преимущественно тезит. Режим обработки пробы тезитом подбирался на основе экспериментальных исследований эмпирическим путем. Для этого использовали различные разведения тезита, различную температуру и различную экспозицию в минутах. При использовании различных концентраций раствора тезита малые концентрации (а именно 1%) не позволяли получить абсолютно прозрачный раствор, а высокие концентрации (а именно 20%) не позволяли выполнить дальнейшее ферментативное исследование триглицеридов печени крыс.

Результат проведенного исследования представлен в таблице 1: «Исследование влияния детергента тезит на получение прозрачного раствора липидов для ферментативного определения триглицеридов печени крыс». Следовательно, оптимальными условиями обработки пробы хлороформного раствора липидов раствором тезита является концентрация 10% в объеме 25 мкл, при температуре 20°C в течение 30 минут с обработкой ее в шейкере с частотой колебаний 120 в минуту.

Экстракция липидов из биологического материала осуществляется общепринятым методом.

Липиды - вещества, имеющие различное химическое строение, но обладающие общим свойством: высокой растворимостью в неполярных растворителях. Имеют гидрофобный характер. Различают нейтральные липиды (свободные жирные кислоты и их эфиры, моно-, ди- и триацилглицерины, стероиды, воски, углеводороды) и полярные липиды (глицерофосфолипиды, сфинго- и гликолипиды, цереброзиды).

При экстракции липидов принимают во внимание то, что они способны не только к гидрофобным взаимодействиям, но и к образованию водородных, электростатических и ковалентных связей (сложноэфирных, амидных, гликозидных). Относительно неполярные растворители (хлороформ, бензол, диэтиловый эфир) разрушают комплексы, образованные гидрофобными взаимодействиями в жировой ткани, хиломикроны, комплексы альбумина с жирными кислотами. Полярные растворители (этанол, метанол) разрушают водородные и электростатические связи. Их применяют в смеси со слабополярными растворителями при экстракции липидов из плазматических мембран, митохондрий, эндоплазматического ретикула печени. Липиды, находящиеся в комплексах, образованных ковалентными связями, растворителями не экстрагируются. Их можно выделить только после гидролиза с использованием органического растворителя.

Наиболее распространенным методом экстракции липидов является метод Фолча. Экстракцию проводят смесью хлороформ-метанол (2:1) из расчета 20 частей экстрагирующей смеси на одну часть ткани. Метод позволяет выделить 90-95% всех клеточных липидов. Смеси растворителей, содержащие спирт, экстрагируют также нелипидные вещества (сахара, аминокислоты, соли и т.д.) Для удаления нелипидных примесей экстракт липидов промывают водой или слабыми солевыми растворами. Однако это приводит к частичной потере кислых липидов.

Липиды легко подвергаются окислению и гидролитической деградаци. Чтобы затормозить эти процессы, экстракцию липидов проводят при комнатной температуре, применяя растворители, из которых предварительно удален кислород. Извлеченные липиды не упаривают досуха и не оставляют в упаренном виде на долгое время, а сразу растворяют. Экстракты липидов следует хранить в плотно закрытой посуде при -20°C и ниже в присутствии инертных газов. Можно применять антиоксиданты, например 2,6-ди-трет-бутил-крезол, который в концентрации 0,005% эффективно предотвращает окислительное расщепление ненасыщенных липидов.

Некоторые растворители содержат или накапливают при хранении вещества, разрушающие липиды. Так, при хранении диэтилового и петролейного эфира накапливаются перекиси, окисляющие двойные связи. При хранении хлороформа и дихлорметана образуется фосген, реагирующий с окси- и аминогруппами. Небольшие количества альдегидов, содержащихся в первичных спиртах, также реагируют с окси- и аминогруппами и активированными метиленовыми группировками.

Чтобы удалить примеси, растворители подвергают специальной обработке. Свежий хлороформ перегоняют и хранят в темной склянке с добавлением 1% метанола или

этанол. Хлороформ после длительного хранения промывают водой, сушат над хлористым кальцием и перегоняют. Метанол и этанол (95 или 99%) перегоняют над гранулированной гидроокисью калия, хранят в темной склянке 1-2 мес.

Процедура экстракции липидов должна приводить к количественному извлечению клеточных липидов в неизменном виде. Липидный экстракт не должен быть загрязнен нелипидными веществами, такими как сахара и аминокислоты.

Эффективность экстракции липидов в значительной степени зависит от химической природы липидных компонентов и от вида комплексов, которые образуют липиды в клетке с другими классами природных соединений. Известны три основных типа взаимодействия липидов с другими веществами.

I тип взаимодействия это:

ван-дер-ваальсово гидрофобное взаимодействие «нейтральных» или неполярных липидов, таких как эфиры стероидов, глицериды, углеводороды, каротиноиды, которое связывает относительно слабыми нековалентными связями их углеводородные цепи с другими липидами или с гидрофобными участками белков. Такое взаимодействие осуществляется, в частности, в жировой ткани, хиломикронах, комплексах альбумина с жирными кислотами, жировых образованиях микробных клеток и т.п.

II тип взаимодействия это:

образование водородных связей - электростатическое или гидрофобное взаимодействие, при котором полярные липиды (фосфатиды, гликолипиды, холестерин) образуют связи с белками, как это имеет место в плазматических мембранах, митохондриях, эндоплазматическом ретикулуме и липопротеинах сыворотки.

III тип взаимодействия это:

образование комплексов, в которых жирные кислоты (нормальные или разветвленные) и оксикислоты связаны ковалентными связями (сложноэфирными, амидными или гликозидными) с полисахаридами, как это имеет место в липополисахаридах клеточных стенок бактерий.

Из комплексов, образованных в результате ван-дер-ваальсового гидрофобного взаимодействия, липиды можно экстрагировать относительно неполярными растворителями, такими как этиловый эфир, хлороформ или бензол. Липиды, связанные в мембранах, экстрагируются полярными растворителями, такими как этанол или метанол, разрушающими водородные связи и нарушающими электростатическое взаимодействие белков с липидами. Ковалентно связанные липиды не экстрагируются никакими растворителями: их можно выделить лишь расщепив комплекс с помощью кислотного или щелочного гидролиза.

При выборе метода экстракции необходимо принимать во внимание и химическую природу липидов. Обычно, чтобы предотвратить окисление двойных связей, непосредственно перед экстракцией растворители перегоняют и удаляют из них перекиси. Растворители, применяемые для извлечения высоконасыщенных липидов, следует дезаэрировать, пропуская через них азот, и затем все операции проводить в атмосфере азота. Липидные экстракты не следует ни упаривать досуха, ни оставлять в упаренном виде на долгое время; извлеченные липиды надо как можно скорее растворять в подходящем растворителе (хлороформе). Температура, при которой проводится экстракция, должна быть не выше комнатной (или ниже, если это необходимо) для того, чтобы затормозить окисление и гидролитическое расщепление липидов. Старые способы экстракции кипящим растворителем в аппарате Сокслета должны быть исключены.

Другой фактор, который следует принимать во внимание, это ферментативная деградация липидов во время экстракции. Вообще, содержащие спирт смеси растворителей вызывают дезактивацию большинства фосфатаз и липаз. Более стабильные ферменты разрушаются при 1-2-минутном контакте с кипящей водой или горячим спиртом.

Из вышесказанного следует, что спирт является необходимым компонентом всех смесей, употребляемых для экстракции липидов, так как он разрушает комплексы липидов с белками, растворяет липиды и дезактивирует ферменты, вызывающие расщепление липидов. Однако смесь растворителей, содержащих спирт, наряду с липидами экстрагирует содержащиеся в клетках нелипидные вещества, такие как сахара, аминокислоты, соли и т.д. Поэтому неочищенный липидный экстракт нужно обработать так, чтобы удалить все водорастворимые примеси. Наиболее распространенной процедурой такого рода является промывка экстракта водой, приводящая в некоторых случаях к образованию очень стабильных эмульсий. Освобождают липиды от нелипидных примесей, также пропуская неочищенные экстракты через колонки, заполненные целлюлозой или сефадексом, или проводя диализ через специальные мембраны.

Одним из наиболее часто применяемых и эффективных способов экстракции липидов является экстракция по Блайю и Дайэру - упрощенный вариант «классической» методики Фолча. При экстракции по этому методу используют

однофазную систему растворителей хлороформ-метанол-вода (1:2:0,9 по объему), которая быстро и эффективно извлекает липиды. Экстракт разбавляют одним объемом воды и одним объемом хлороформа. В результате образуется двухфазная система, нижний слой которой состоит из хлороформа, а верхний - из смеси метанола и воды. Водорастворимые не липидные примеси переходят в вводно-метанольный слой, в то время как в хлороформном слое остаются липиды, практически свободные от загрязнений.

Дальнейшее исследование липидов проводится с помощью тонкослойной хроматографии и других химических методов. Существуют стандартные ферментативные методы исследования концентрации липидов в прозрачных средах. Для получения такой среды в хлороформ добавляют поверхностно-активные вещества, неполярные детергенты, такие как тезит (Polidocanol).

В настоящее время тезит (Polidocanol) широко используется не только в биохимии, но и в фармации для лечения нейродермита, дерматоза, экземы, а также для склерозирования вен нижних конечностей с эффектом анестетика в сочетании с гиалуронидазой (Europäische Arzneibuch-Kommission (Hrsg.): EUROPÄISCHE PHARMAKOPÖE 6. AUSGABE. 6.0-6.2, 2008) и в косметологии (Polidocanol in kosmetischen Mitteln (http://www.bfr.bund.de/cm/343/polidocanol_in_kosmetischen_mitteln.pdf), Stellungnahme des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR) vom 15. October 2003), а также при выполнении научно-исследовательских работ работ (Datenblatt Nonaethylene glycol monododecyl ether (<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIGMA/P9641>) bei Sigma-Aldrich, Abgerufen am 21. April 2011; Opinion of the scientific Committee on Consumer Products (SCCP) on polidocanol (laureth-9) (http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_113.pdf) vom 2/October 2007; Request for a scientific opinion: Polidocanol CAS No 3055-99-0. EC No 221-284-4 Submission II (http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccp_q_048.pdf) vom 21. Januar 2011).

Однако в клинической лабораторной практике наиболее значимо использование тезита для изучения концентрации липидов в липидных экстрактах. Все сказанное свидетельствует о крайней важности разработки способов лабораторных исследований высокоточных и чувствительных методов количественного исследования липидов разных тканей. В тоже время популярность способа количественной оценки липидов тканей в хлороформных экстрактах с добавлением детергента обусловлена его высокой чувствительностью, простотой осуществления и достаточной адекватностью получаемых результатов (Клиническая лабораторная диагностика, №10, 2008, с. 21-32).

При функционировании печени в норме, а также при токсическом повреждении печени важную роль играет обмен фосфолипидов. Известно, что фосфолипиды «цементируют» клеточную мембрану в том месте, где она подверглась повреждающему воздействию. В нормальной живой клетке идет постоянное самообновление всех ее мембран за счет постоянного входа-выхода фосфолипидных молекул. Необходимым условием для этого является достаточное наличие в организме фосфолипидов. Дефицит фосфолипидов замедляет «текущий ремонт» и сразу же приводит к различным нарушениям уже на уровне клеточных мембран. Замедление текущего ремонта клеточных мембран неспецифично. Оно может наблюдаться при любом токсическом повреждении печени. Даже аллергия развивается потому, что самообновление клеточных мембран протекает недостаточно интенсивно.

Фосфолипиды широко представлены во всех тканях организма. Так фосфолипиды не только составляют основу мембран нервных клеток, но они являются также основным компонентом оболочек нервных стволов как крупных, так и мелких нервов. Так сфингомиелин формирует оболочки нервных стволов.

Самое большое количество фосфолипидов в составе клеточных мембран содержит печень. Ее клеточные мембраны на 65% состоят из фосфолипидов, которые, в свою очередь, на 40% состоят из фосфатидилхолина. Вслед за печенью по удельному весу фосфолипидов в мембранах клеток следует головной мозг и сердце.

Кроме фосфолипидов и холестерина к главным компонентам клеточных мембран принадлежат так называемые внутренние белки. Эти белки являются рецепторами для гормонов и биологически активных веществ, и их нормальное функционирование зависит от окружающих их фосфолипидных молекул. При дефиците фосфолипидов рецепторные функции клетки сразу же нарушаются и восстанавливаются только при добавлении в пищу достаточного количества фосфолипидов. Фосфолипиды, таким образом, являются активаторами мембранных белков-рецепторов.

Помимо выполнения чисто структурных функций фосфолипиды активно участвуют в проведении нервного импульса, они активизируют мембранные и лизосомальные ферменты. Фосфолипиды участвуют в свертывании крови, реакциях иммунитета, в

регенерации тканей, в переносе электронов по цепи дыхательных ферментов («тканевое дыхание»). Особая роль фосфолипидов в обмене веществ во многом обусловлена тем, что они содержат лабильные (легко отщепляемые) металльные радикалы - СНЗ. Метильные радикалы необходимы для многих биосинтетических процессов, протекающих в организме, и их вечно не хватает. Не одни только фосфолипиды могут быть источниками свободных метильных радикалов. Есть и другие доноры, но роль фосфолипидов - одна из основных. Совершенно особая роль фосфолипидов - транспортная. Именно они образуют липопротеидные комплексы, транспортирующие в крови холестерин к тканям и от тканей к печени.

Наиболее активно биосинтез фосфолипидов происходит в печени, за ней по степени активности синтеза следуют стенка кишечника, семенники, яичники, молочные железы и другие ткани. Значительную часть фосфолипидов человек получает и с пищей.

Существует такое понятие, как «жидкостьность» клеточных мембран. Клетка постоянно обменивается различными веществами с окружающей ее внешней средой. Через наружную клеточную мембрану внутрь клетки поступают все питательные вещества, некоторые гормоны, витамины, биорегуляторы и т.д. При потере мембраной своих жидкостных свойств такой транспорт сразу затрудняется. Насыщенные жирные кислоты и холестерин повышают ригидность (твердость) клеточных мембран. Вот почему с возрастом клетка все хуже и хуже реагирует на гормональные сигналы и анаболические стимулы. Фосфолипиды и ненасыщенные жирные кислоты, наоборот, устраняют ригидность клеточных мембран и повышают ее жидкостные свойства. Клетка как бы «оживает» и начинает более активный обмен метаболитами с окружающей средой. Ее чувствительность к гормональным и негормональным сигналам повышается. Фосфотидилхолин, являющийся фосфолипидом и в то же время содержащий ненасыщенные жирные кислоты, выступает своеобразным фактором «омоложения» клеточных мембран и, в конечном итоге, всего организма. При остром токсическом повреждении печени уровень фосфолипидов в печени резко снижен.

Фосфолипидные молекулы деформируются и разрушаются в том месте, где на мембрану действуют какие-либо неблагоприятные факторы внешней и внутренней среды.

Деформированные молекулы либо их осколки покидают клеточную мембрану, и взамен на их место входят другие фосфолипидные молекулы.

Несмотря на то что организм обладает способностью синтезировать фосфолипиды сам, его возможности в этом плане далеко не беспредельны. Они могут не соответствовать текущим потребностям. Введение в организм фосфолипидов извне является для него очень хорошим подспорьем, усваиваются они очень быстро и с поразительной точностью «латают» мембранные дефекты, где бы ни находились пораженные клетки.

Фосфолипиды обладают выраженным антиоксидантным действием, уменьшая образование в организме высокотоксичных свободных радикалов. Свободные радикалы действуют на все клеточные мембраны, способствуют развитию острого токсического повреждения печени. Среди всех видов патологии свободнорадикальное окисление является ведущим, и именно от его выраженности зависит скорость наступления тех или иных возрастных нарушений.

Роль «фосфолипидной подпитки» в профилактике и лечении заболеваний организма и развития возрастных изменений очень велика.

Показательно то, что фосфолипиды задерживают по времени развитие раковых опухолей в 2 раза (при адекватных дозировках), даже на самых последних стадиях развития заболевания. Этот результат был получен в экспериментах на мышах, а затем подтвержден у людей. Следовательно как в эксперименте, так и в клинической практике необходимо комплексное исследование триглицеридов (ТАГ), общих фосфолипидов (ОФЛ), холестерина (ХС) одновременно с анализом белков и липидов крови.

При остром токсическом повреждении печени отмечается значительный рост уровня ТАГ на 1 г массы печени при менее выраженной динамике роста уровня общих фосфолипидов (ОФЛ). Изменяется соотношения ОФЛ/ТАГ при росте в крови активности АЛАТ.

Существенные признаки, характеризующие изобретение, проявили в заявляемой совокупности новые свойства, явным образом не вытекающие из уровня техники в данной области, и не являются очевидными для специалиста.

Идентичной совокупности признаков не обнаружено при изучении патентной и научно-медицинской литературы.

Данное изобретение может быть использовано в медицинской практике для повышения точности изучения липидов тканей при ишемической болезни сердца и других заболеваниях. Таким образом, следует считать предлагаемое изобретение соответствующим условиям патентоспособности: «новизна», «изобретательский уровень», «промышленная применимость».

Метод основан на экстракции липидов тканей смесью Фолча (Российский химико-аналитический портал; Folch, J.A simple method for the isolation and purification of total animal tissue/Folch, M Jees, Sloane Stanley g.H. // The Journal of Biological Chemistry. - 1957. - №1. - P.497-509) с последующим исследованием уровня общих фосфолипидов, триглицеридов и активности аланинаминотрансферазы.

Способ прототип осуществляется следующим образом:

К 6 г печени крысы добавляют 3 мл воды и измельчают в гомогенизаторе Поттера-Эльвехейма (Potter-Elvehjem). Гомогенизат центрифугируют, супернатант декантируют и остаток экстрагируют 38 мл смеси: хлороформ-метанол-вода (1:2:0,9 по объему) в гомогенизаторе в течение 2-х минут. Ткань отделяют центрифугированием. Объединенный супернатант разбавляют 20 мл хлороформа и 20 мл воды. Вводно-метанольную и хлороформную фазу разделяют центрифугированием. Нижний хлороформный слой концентрируют на ротационном испарителе при 35°C. Для удаления воды добавляют бензол и упаривают его в вакууме. К упаренному остатку липидов добавляют 10 мл хлороформа с 25 мкл 20% раствора тезита при одновременном перемешивании смеси с помощью шейкера ПЭ-6300М при 20°C и частоте колебания платформы 120 в минуту в течение 30 минут с последующим определением триглицеридов ферментативным методом набором «триглицерол-ново» (жидкая форма) кат. №В8322 фирмы «вектор» БЭСТ (г.Новосибирск) при длине волны 500 нм спектрофотометрически при 25°C. Опытная и калибровочная проба составляют 10 мкг. Концентрацию триацилглицеридов рассчитывают по формуле $C = E/E_k \times 2,29$, где 2,29 - концентрация триглицеридов в калибраторе, ммоль/л, делают перерасчет на 1,00 г сырого веса печени.

Уровень общих фосфолипидов определяли ферментативным методом (№ по каталогу 17320. Клиническая биохимия биохимические наборы. Принцип метода: Под действием фосфолипазы-Д фосфолипиды гидролизуются до холина и фосфатидной кислоты. Затем холин окисляется холиноксидазой до бетаина и перекиси водорода, которая в присутствии пероксидазы реагирует с 4-аминоантипирином и производными фенола с образованием комплекса красного цвета. Оптическая плотность образующегося стабильного комплекса пропорциональна содержанию фосфолипидов в пробе. Фосфолипиды определяли в 10 мкг опытной и калибровочной пробы по схеме.

СХЕМА ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Перед проведением анализа реагенты следует прогреть до 37°C. Температура должна быть стабильной ($\pm 0,5^\circ\text{C}$) в течение всего определения.

Добавить в кюветы (мкл)	Холостая проба	Калибровочная проба	Опытная проба
Дистиллированная вода	10	-	-
Стандарт фосфолипидов	-	10	-
Проба	-	-	10
Раствор R ₁	1000	1000	1000

Перемешать, инкубировать 10 минут, измерить оптическую плотность пробы/стандарта против холостой пробы.

Окраска стабильна в течение 30 минут.

Пропорциональное изменение объемов реагентов и пробы не влияет на конечный результат. Измерение: по конечной точке увеличения оптической плотности. Делают перерасчет на 1 г сырого веса печени.

На результат теста не влияет присутствие в пробе гемоглобина в концентрации до 5,0 г/л, билирубина в концентрации до 428 мкмоль/л и триацилглицеридов в концентрации до 11,4 ммоль/л.

Активность аланинаминотрансферазы в сыворотке крови определяли стандартным набором.

Аланинаминотрансфераза (АЛТ/АЛТ) и аспартатаминотрансфераза (АСТ/АСТ) являются ферментами и принадлежат к группе аминотрансфераз, которые катализируют обратимое превращение α -кетокислот в аминокислоты путем переноса аминогрупп. АСТ и АЛТ в нормальном состоянии присутствуют в плазме крови, желчи, спинно-мозговой жидкости, слюне человека, в моче. При вирусном гепатите и других формах болезней печени, связанных с некрозом, содержание АСТ и АЛТ в сыворотке увеличивается даже до проявления клинических признаков и симптомов возникновения болезни. Уровень содержания обоих ферментов может превышать верхний предел нормальной концентрации до 100 раз, хотя наиболее часто встречаются повышение содержания в 20-50 раз. Хотя концентрация АСТ и АЛТ увеличивается при любых процессах, поражающих клетки печени, АЛТ является более специфичным для печени ферментом. Повышение активности АСТ может быть так же связано с повреждением сердечной или скелетных мышц.

Методика определения:

АЛТ катализирует перенос аминогруппы от аланина к оксоглутарату с образованием глутамата и пирувата. Пируват восстанавливается до лактата с

помощью лактатдегидрогеназы (ЛДГ).

L-аланин+2-оксоглутарат->L-глутамат+пируват

Пируват+НАД-Н+H⁺->D-лактат+НАД+

В этой же реакции эквивалентное количество НАД-Н окисляется до НАД. В результате этого происходит уменьшение поглощения света раствором при 340 нм, пропорциональное активности АЛТ в сыворотке.

Вычисление результатов.

Результаты вычисляются автоматически анализатором Konelab следующим образом:

активность в МЕ/л=dA/мин × коэффициент

коэффициент = $V_{\text{общ}} \times 1000 / 6,3 \times V_{\text{обр}} \times P$,

где $V_{\text{общ}}$ - общий объем реакционной смеси в мл;

$V_{\text{обр}}$ - объем образца в мл;

6,3 - коэффициент экстинкции НАД-Н при 340 нм;

P - длина кюветы = 1.

Результат выражают в моль/л.

Исследование триглицеридов, общих фосфолипидов и активности АЛТ по способу-прототипу и предлагаемому способу выполнялось 20 раз. Результаты исследования обработаны статистически с использованием пакета программ StatSoft Statistica v6.0 с определением среднеарифметического (M) и его ошибки (m).

Эксперименты проводили на 20 крысах самцах массой 200±20 г, которые содержались в виварии на естественном световом режиме, свободном доступе к воде и пище, на стандартном рационе. Для развития острого токсического повреждения печени крысам ежедневно в течение 4-х дней вводили 50% масляный раствор тетрахлорметана в дозе 1 мг/кг. Крысам контрольной группы (n=10) вводили такой объем растительного масла в течение 4-х дней перорально с помощью зонда. В контроле уровень ТАГ в печени крыс при исследовании по способу-прототипу составил 6,2±0,6 мг/г сырой массы печени, общих фосфолипидов 11,2±1,0 мг/г сырой массы печени, а при исследовании по предлагаемому способу уровень ТАГ печени составил 8,7±0,6 мг/г сырой массы, а общих фосфолипидов 12,98±1,1 мг/г сырой массы (n=10). При остром токсическом повреждении печени уровень ТАГ печени по способу-прототипу составил 16,2±1,3 мг/г сырой массы, а общих фосфолипидов 17,1±1,4 мг/г сырой массы, а при исследовании по предлагаемому способу уровень ТАГ составил 18,3±1,5 мг/г сырой массы, а общих фосфолипидов 20,1±1,7 мг/г сырой массы (n=30).

В контроле в печени соотношение ОФЛ/ТАГ составило 1,8±0,2, а при остром токсическом повреждении печени крыс отношение ОФЛ/ТАГ составило 1,1±0,1 и менее за счет увеличения уровня ТАГ, превышавшего рост содержания ОФЛ в печени. При этом результат, полученный по новому предлагаемому способу, был на 15% точнее такового, полученного по способу-прототипу. Наличие острого токсического повреждения печени характеризовалось ростом в крови активности АЛТ, которая в контроле была равна 0,25±0,01 ммоль/лхч, а при патологии составила 0,58±0,06 ммоль/лхч (табл.2), что свидетельствовало о начале некротического процесса в печени. Острое токсическое повреждение печени в эксперименте было подтверждено результатами гистохимического и морфологического исследований.

Следовательно такой комплексный анализ большого числа биохимических показателей позволил более точно оценить раннюю диагностику острого токсического повреждения печени в эксперименте.

Итак, при применении способа-прототипа был получен недостаточно точный результат, что связано с недостаточной прозрачностью исследуемого раствора, а наиболее эффективным и точным был предлагаемый способ.

При этом предлагаемый способ прост в исполнении и интерпретации полученных результатов.

Детергент	Концентрация	Время инкубации	Температура, °C	Результат
Тезит	25 мкл 1%	20 мин	15	-
Тезит	25 мкл 1%	30 мин	20	-
Тезит	25 мкл 1%	40 мин	25	-
Тезит	25 мкл 10%	20 мин	15	-
Тезит	25 мкл 10%	30 мин	20	Раствор прозрачный
Тезит	25 мкл 10%	40 мин	25	-
Тезит	25 мкл 20%	20 мин	15	-
Тезит	25 мкл 20%	30 мин	20	-
Тезит	25 мкл 20%	40 мин	25	-

Таблица 2			
Изменение биохимических показателей печени и крови при остром токсическом повреждении печени			
Исследуемые показатели	Контроль (n=10)	Исследование при патологии по способу-прототипу (n=20)	Исследование при патологии по предлагаемому способу (n=20)
Общих фосфолипидов (мг/г сырой массы печени)	11,2±1,0	17,1±1,4	20,1±1,7
Триглицериды (мг/г сырой массы печени)	6,2±0,6	16,2±1,3	18,3±1,5
Отношение ОФЛ/ТАГ	1,8±0,2	1,05±0,1	1,1±0,09
Аланинаминотрансфераза сыворотки крови (моль/л·ч)	0,25±0,02		0,56±0,06
Примечание: все полученные в эксперименте результаты достоверны по отношению к таковым в группе контроля.			

Формула изобретения

Способ диагностики острого токсического повреждения печени крыс путем хлороформной экстракции липидов печени по Фолчу, отличающийся тем, что дополнительно добавляют 25 мкл 10% раствора тезита при одновременном перемешивании смеси с помощью шейкера при 20°C и частоте колебаний 120 в минуту в течение 30 минут с последующим определением в растворе общих фосфолипидов и триглицеридов и при их соотношении, равном 1,01-1,9, при росте активности в крови аланинаминотрансферазы 0,50-0,62 ммоль/л и более диагностируют острое токсическое повреждение печени крыс.

ИЗВЕЩЕНИЯ

ММ4А Досрочное прекращение действия патента из-за неуплаты в установленный срок пошлины за поддержание патента в силе

Дата прекращения действия патента: **07.11.2014**

Дата публикации: [20.08.2015](#)