

**РАЗРАБОТАННЫЕ И ВНЕДРЕННЫЕ В МЕДИЦИНСКУЮ ПРАКТИКУ
ИННОВАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ
МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ, ОБУСЛОВЛИВАЮЩИХ
ФОРМИРОВАНИЕ МЕМБРАННОЙ ПАТОЛОГИИ**

Камышников В. С.¹, Литвинко Н. М.², Воробей А. В.¹, Юрага Т. М.¹, Скоростецкая Л. А.²

*¹Государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования»,
г. Минск, Республика Беларусь*

*²Государственное научное учреждение «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси»,
г. Минск, Республика Беларусь*

Реферат. В ходе научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ в рамках финансируемых целевым назначением тем НИР созданы две уникальные, не имеющие аналогов, тест-системы, адаптированные к ординарному фотометрическому оборудованию клиничко-диагностических лабораторий лечебно-профилактических учреждений. Их использование значительно расширяет возможности клинического применения технологий исследования общей антиокислительной и фосфолипазной активности, что особенно важно для выявления отдельных форм мембранной патологии.

Ключевые слова: мембранная патология, фосфолипаза, общая антиокислительная активность, острый некротизирующий панкреатит, поджелудочная железа.

Введение. В основу разработки новых технологий исследования метаболизма мембранной патологии была положена концепция о тесном сопряжении совершаемых в мембранах процессов свободнорадикального окисления и фосфолиполиза, обусловленного активностью фосфолипазы А₂ (далее — ФЛА₂), оптимальным субстратом которой являются окисленные фосфолипиды [1].

Сопровождаемая снижением антиокислительной защиты организма активация перекисного окисления липидов (далее — ПОЛ) обуславливает усиленное образование продуктов окисления фосфолипидов, что в свою очередь приводит к повышению активности ФЛА₂, изменению качественного и количественного состава фосфолипидов мембран, накоплению в них проявляющих детергентное действие лизофосфатидилхолинов, образованию биологически активных продуктов превращения высвобожденных под влиянием ФЛА₂ полиненасыщенных (арахидоновая и др.) жирных кислот (простагландины, простаглицлины и другие эйкозаноиды), способных оказывать деструктивное действие на мембраны клеточных элементов [1].

Цель работы — создание новых лабораторно-диагностических технологий, использование которых позволяет получить представление о тесно связанных между собой метаболических процессах свободнорадикального окисления и фосфолиполиза, влияющих на формирование мембранной патологии.

Для реализации поставленной цели было осуществлено решение ряда задач, в числе которых:

1. Выполнением тем НИР, направленных на создание новых, оригинальных лабораторно-диагностических тест-систем в рамках подпрограммы «Диагностикумы» ГП «Импортозамещающая фармпродукция» (срок выполнения 2010–2014 гг. до 2020 г.), а именно:

1.1. «Разработка и освоение технологии производства набора реагентов на базе стабильных радикалов для характеристики антирадикальной активности биологических жидкостей» (научные руководители проф. Киселев П. А. (ИБОХ НАН Беларуси) и проф. Камышников В. С. (БелМАПО).

1.2. «Разработка и апробация новой биохимической тест-системы для выявления воспалительных процессов желудочно-кишечного тракта по фотометрическому определению активности панкреатической фосфолипазы А₂ в крови» (научные руководители д-р хим. наук Литвинко Н. М. (ИБОХ НАН Беларуси) и проф. Камышников В. С. (БелМАПО).

2. Экспериментальные (на животных) и клинические испытания новых технологий лабораторного исследования, осуществленные в рамках следующих тем НИР:

2.1. «Лабораторная верификация патохимических изменений в поджелудочной железе при экспериментальном панкреатите» (ГПНИ «Конвергенция» «Супрамолекулярный комплекс жирной кислоты с гемоглобином как индикатор фосфолиполиза: физико-химические исследования и возможности использования в ранней диагностике экспериментального панкреатита»).

2.2. «Клинико-лабораторное исследование антиокислительной активности сыворотки крови в норме и при отдельных формах патологии с использованием технологии, базирующейся на применении стабильных радикалов» (задание ГП «Импортозамещающая фармпродукция» «Разработка и освоение технологии производства набора реагентов на базе стабильных радикалов для характеристики антирадикальной активности биологических жидкостей»).

2.3. «Клинико-лабораторное обоснование методологии исследования и оценки состояния защитных свойств биологических жидкостей при мембранной патологии» (задание «Сопряжение превращения фосфолипидов с системами биохимической защиты при патологических состояниях организма» подпрограммы 2.2 «Биологически активные вещества» ГПНИ «Химические технологии и материалы»).

По результатам клинико-лабораторных испытаний Министерством здравоохранения Республики Беларусь осуществлена регистрация набора реагентов «Тест-система для скрининга биологических жидкостей и фармсубстанций на антиоксидантную активность «ОксиСтат» и набора реагентов «Тест-система для определения активности панкреатической фосфолипазы А₂».

Созданные тест-системы включены в Каталог Ярмарки инновационных разработок «Химические технологии и наноиндустрия» 2016 г.

С их применением выполнены характеризующие лабораторно-диагностическую значимость предложенных тестов экспериментальные (с моделированным на животных панкреатитом) и клинические исследования [2, 3].

1. Экспериментальный раздел работы

Материалы и методы. Эксперимент по моделированию панкреатита проведен на 108 рандом-бредных белых крысах обоего пола в возрасте 12–14 недель, содержащихся в стационарных условиях вивария БелМАПО на полноценном стандартном пищевом рационе в соответствии с необходимыми требованиями, в т. ч. требованиями «Европейской конвенции по защите позвоночных, используемых для экспериментальных и иных научных целей» (Страсбург, 1986). Инвазивные вмешательства и выведение животных из эксперимента производили под общей анестезией с внутрибрюшинным введением раствора тиопентала натрия (70 мг/кг).

Контингент лабораторных животных был распределен на восемь групп: контрольную, представленную 6 экспериментальными животными, у которых выполнена лапаротомия без моделирования острого некротизирующего панкреатита (далее — ОНП), и опытные, включавшие по 6 животных, исследованных на 1–3-е сут моделирования ОНП. Наряду с этим исследованы группы животных, леченные ксефокамом (15 животных), альфа-лизином эсцинатом (15 животных), лейкоцином (15 животных), метранидазолом (15 животных).

Выведение из эксперимента осуществляли через 4; 24; 48 и 72 ч. Животных еженедельно взвешивали. Перед выведением из эксперимента собирали суточную мочу для общеклинических и биохимических исследований.

Взятие крови у экспериментальных животных (крысы) проводили путем декапитации. Животных предварительно выдерживали в термостате в течение 2–5 мин при температуре 40–42 °С (при которой происходит повышение обмена веществ и как бы «разжижение», по терминологии отдельных авторов, крови крыс).

Отделение эритроцитов от плазмы взятой крови проводилось методом центрифугирования при 1500 об./мин в течение 10 мин на центрифуге типа ОПН-3 и другой аналогичной (Латвия): не позже 1 ч с момента взятия крови.

Сыворотку крови использовали для определения содержания билирубина, креатинина, С-реактивного белка, общей антиоксидантной активности (далее — ОАА), активности ФЛА₂, аланин- и аспаргатаминотрансферазы (АлАТ, АсАТ), гамма-глутамилтранспептидазы (γ-ГГТ), α-амилазы, содержание α1-антитрипсина, церулоплазмينا.

Одноэтапный метод оценки ОАА основывается на учете степени подавления антиоксидантами процесса формирования стабильного радикала АБТС: при взаимодействии антиоксидантов с АБТС на-

блюдается уменьшение оптической плотности катион-радикала в диапазоне длин волн 600–800 нм пропорционально концентрации и активности антиоксиданта.

Активность ФЛА2 определяли гемопротеидным методом по разработанной новой технологии исследования, особенность которой состоит как в использовании мицеллярной формы субстрата, так и в учете результатов ферментативной активности путем регистрации разностного спектра. Принцип предложенного метода состоит в том, что высвобожденная в процессе фосфолиполиза, осуществляемого с участием ФЛА2 сыворотки крови, жирная кислота превращает метгемоглобин в гемихром, что регистрируется спектрофотометрически при записи в кинетическом режиме дифференциального спектра в видимой области по появлению пика с максимумом абсорбции при 423 нм и минимумом при 405 нм. Интенсивность поглощения между этими экстремумами пропорциональна концентрации образующейся жирной кислоты, а, следовательно, и активности ФЛА2.

С использованием общепринятых методов исследования определялись метаболические показатели сыворотки крови и мочи.

Результаты и их обсуждение. В результате работы создана и научно обоснована модель экспериментального некротизирующего панкреатита путем одномоментной перевязки билиопанкреатического протока у места его впадения в 12-перстную кишку: формирование панкреатита подтверждено результатами патоморфологического и биохимического исследований [4].

Осуществлена сравнительная оценка степени соответствия морфологических изменений в поджелудочной железе происходящим в организме сдвигам в ферментативных и неферментативных системах метаболизма при экспериментальном ОНП. Выполнена сравнительная оценка степени соответствия морфологических изменений в поджелудочной железе происходящим в организме сдвигам в ферментативных и неферментативных показателях метаболизма при экспериментальном ОНП. Установлено, что наибольшая выраженность биохимических и морфологических изменений приходится на 2 и 3-е сут эксперимента, что соответствовало клиническим и морфологическим проявлениям степени тяжести заболевания [5].

В опытах на животных использован оригинальный тест формирования супрамолекулярного комплекса жирной кислоты с гемоглобином как индикатор фосфолиполиза при экспериментальном ОНП. Установлено, что наибольшая активация ФЛА2 происходит в первые часы и сутки от начала эксперимента.

Результаты экспериментальных исследований показали реальную возможность использования разработанного набора реагентов в клинической практике при диагностике тяжелых форм ОНП в качестве информативного лабораторного теста.

Наряду с оценкой картины патохимических изменений представлены результаты лечения тяжелых форм ОНП с использованием новых, в основном отечественных, доступных и достаточно эффективных медикаментозных комплексов.

Выполнено исследование эффективности парентерального введения лейкоцима, лизина-эсцината, ксефокама (лорноксикама) для лечения ОНП в эксперименте. Доказана (лабораторно и морфологически подтверждена) высокая эффективность лизина-эсцината и ксефокама в первые 3-е сут развития экспериментального ОНП.

Результаты осуществленного экспериментального исследования позволили установить существенную особенность динамики изменения активности ФЛА2, кардинально отличающую таковую от динамики изменения показателей других, общепринятых лабораторных тестов диагностики острого панкреатита и служащую научным обоснованием использования теста определения активности ФЛА2 для выявления процессов деструкции в поджелудочной железе. Будучи мембранным ферментом, панкреатическая ФЛА2 увеличением своей активности отражает поражение мембран клеток, вызванное некробиотическим процессом, тогда как все остальные ферментативные (и многие неферментативные) тесты — преимущественно общий отклик организма на развитие воспалительного процесса в поджелудочной железе. В пользу данного объяснения свидетельствует и то, что положительный лечебный эффект оказали те испытанные в ходе настоящей работы лекарственные препараты, под влиянием которых у животных не наблюдалось увеличения активности ФЛА2 в динамике развития ОНП. Это послужило научным обоснованием возможности дальнейшего использования в медицинской практике как нового метода диагностики панкреатита — определения активности ФЛА2, так и лекарственных препаратов, оказавших выраженный лечебный эффект в опытах на животных.

II. Клинический раздел работы

Материалы и методы. Объектом исследования явился 101 пациент. Контингент исследованных включал в себя 60 человек, страдающих формами онкологической патологии, находившихся на лечении ГУ «РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова», 21 пациент ГУ «РНПЦ "Кардиология"» с сердечно-сосудистой патологией, 20 пациентов с острой хирургической патологией,

находившихся на лечении в хирургическом отделении УЗ «Минская областная клиническая больница» и 47 взрослых людей — доноров отделения переливания крови УЗ МОКБ, составивших группу сравнения.

В соответствии с поставленными задачами этого этапа использованы следующие методы исследования:

а) сертифицированные (зарегистрированные Министерством здравоохранения Республики Беларусь) методы определения водо- и жирорастворимых антиоксидантов на аппарате «Фотохем»;

б) определение общей АОА с помощью тест-системы, соответствующей таковой, производимой фирмой «Randox» (Великобритания): поставлялась УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси» (позволила реализовать базовый метод исследования).

Принцип осуществляемого с ее применением метода состоит в предварительном образовании радикала АБТСR+ при взаимодействии АБТС (2,2-азино-бис-[3-этилбензтиазолин-6-сульфоислоты] – диаммонийную соль) с метмиоглобином и перекисью водорода (гидропероксидом -- H_2O_2) с последующим воздействием на него антиоксидантов исследуемы хпроб. Полученный раствор имеет достаточно стабильный зелено-голубой цвет, оптическая плотность которого измеряется в области длин волн 620–730 нм. Антиоксиданты, содержащиеся в тестируемой пробе, подавляют развитие окраски пропорционально их концентрации в образце;

в) модифицированный метод определения антиоксидантной активности биологических жидкостей, состоящий в применении уже «готового», стабильного радикала.

Отличается от базового одноэтапностью оценки степени подавления антиоксидантами процесса формирования стабильного радикала АБТС. Принцип работы состоит в том, что при взаимодействии антиоксидантов с АБТС наблюдается уменьшение оптической плотности катион-радикала в диапазоне длин волн 600–800 нм пропорционально концентрации и активности антиоксиданта.

Об активности ПОЛ судили по содержанию его первичных и вторичных продуктов — диенконъюгатов, малонового диальдегида (далее — МДА). Для количественной характеристики процессов ПОЛ использовали показатели УФ-поглощения липидных экстрактов при длине волны 233 нм, соответствующие поглощению соединений с конъюгированным типом связи. Расчет проводили в единицах оптической плотности на 1 мл плазмы. В сыворотке крови определяли содержание МДА с помощью тиобарбитуровой кислоты.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием программы Statistica 6.0.

Результаты и их обсуждение. В ходе исследования осуществлены:

- оценка аналитических и клинико-лабораторных характеристик разработанных и произведенных на базе УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси» базового и модифицированного вариантов наборов реагентов для определения ОАА биологических жидкостей,

- оценка аналитических и лабораторно-диагностических свойств разрабатываемых наборов реагентов ОАА в сравнении с другими методами определения ОАА сыворотки крови — на основе регистрации фотосенсибилизированной хемиллюминесценции ACL и ACW компонентов сыворотки крови.

Установлено, что реализуемые с использованием разработанных наборов реагентов способы определения ОАА имеют рабочие характеристики, соответствующие регламентированным, удовлетворяют надлежащим требованиям, предъявляемым к критериям оценки аналитической и диагностической надежности методов [6].

В исследуемых группах пациентов с онкологической патологией (рак легкого, желудочно-кишечного тракта) показатели ОАА ниже аналогичных значений ОАА сыворотки крови группы сравнения ($1,056 \pm 0,156$ ммоль/л).

Средние значения общей АОА в исследуемой группе пациентов с сердечно-сосудистой патологией также оказались ниже границы референсного интервала ($1,056 \pm 0,156$ ммоль/л).

Заключение. В результате совместной творческой деятельности специалистов в области химии и лабораторной медицины, осуществленной в рамках заданий Государственных программ, курируемых НАН Беларуси, созданы уникальные, открывающие новые перспективы в решении задач практического здравоохранения тест-системы, использование которых предоставляет широкие возможности в решении задач практического здравоохранения.

В ходе выполнения работ создана не имеющая аналогов тест-система, включающая в себя в качестве основного один-единственный реактив — на базе стабильных радикалов (АБТС++), способный изменять выраженность своей окраски при добавлении к нему минимального количества испытуемой жидкости, содержащей антиоксиданты — как биологической, так и иной природы: экстракта растений либо лекарственных препаратов.

Производство зарегистрированных Министерством здравоохранения Республики Беларусь наборов реагентов «Оксистат» освоено на базе Хозрасчетного опытного предприятия Института биооргани-

ческой химии Национальной академии наук Беларуси. Эти наборы реагентов уже нашли широкое применение в научно-практических исследованиях по оценке антиоксидантного статуса организма, в т. ч. у детей (допускается возможность исследования капиллярной крови) и пациентов, страдающих ОПН и другими формами патологии.

В ходе исследования отмечено, что ослабление антиокислительной защиты организма происходит на фоне увеличения активности ФЛА2, влияющей на фосфолипидный состав мембран.

В связи с этим создана новая, не имеющая в мире аналогов тест-система — «ФЛА2-ФОА», предназначенная для определения активности панкреатической ФЛА2. В ее основе лежит защищенная двумя патентами на изобретение технология, базирующаяся на регистрации изменений в спектрах поглощения, вызванных процессом связывания с гемоглобином отщепленного от молекулы фосфолипида остатка жирной кислоты.

В ходе экспериментального и клинического исследований установлено, что в отличие от других маркеров панкреатита разработанный лабораторный тест позволяет выявлять деструктивные формы панкреатита, требующие неотложного хирургического лечения.

Диагностическая надежность этого оригинального метода подтверждена результатами экспериментального исследования по моделированию острого панкреатита у крыс, выполненного в рамках задания программы «Конвергенция» — «Лабораторная верификация патохимических изменений в поджелудочной железе при экспериментальном панкреатите» (2015 г.).

Результаты экспериментального исследования подтвердили данные клинического наблюдения о том, что тест определения активности панкреатической ФЛА2 является идеальным маркером деструктивной формы панкреатита.

Литература

1. Липопротеин-ассоциированная и секреторная фосфолипазы А2: особенности метаболического влияния и клиническая значимость исследования / В. С Камышников [и др.] // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. — 2017. — № 2. — С. 44–54.

2. Набор реагентов «ФЛА2-ФОА» для определения активности панкреатической фосфолипазы А2 в крови человека методом фотометрического анализа / Н. М. Литвинко [и др.] // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. — 2016. — № 5 (1). — С. 121.

3. Клинико-лабораторная оценка антиоксидантного статуса организма / П. А. Киселев [и др.] // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. — 2014. — № 3. — С. 12.

4. Лабораторно-диагностические исследования, обосновывающие адекватность выбора экспериментальной модели формирования острого некротического панкреатита у экспериментальных животных / В. С. Камышников [и др.] // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. — 2016. — № 5 (1). — С. 94–95.

5. Морфологическая и лабораторная верификация патохимических изменений в поджелудочной железе при экспериментальном остром некротизирующем панкреатите // Научные исследования в медицине : от теории к практике : сб. науч. тр. / М-во здравоохранения Респ. Беларусь. БелМАПО ; под ред. М. А. Герасименко [и др.]. — Минск : БелМАПО, 2016. — С. 207–208.

6. Аналитическая характеристика экспериментального образца тест-системы для оценки общей антиокислительной активности сыворотки крови, базирующейся на применении стабильных радикалов / Н. Н. Кохнович [и др.] // Современные проблемы радиационной медицины: от науки к практике : тез. междунар. науч.-практ. конф., Гомель, 2013 г. — Гомель, 2013. — С. 33–34.

DEVELOPED AND IMPLEMENTED INTO MEDICAL PRACTICE OF INNOVATIVE TECHNOLOGY, CLINICAL LABORATORY INVESTIGATIONS METABOLIC DISORDERS, CONTRIBUTING TO THE FORMATION OF MEMBRANE PATHOLOGY

Kamyshnikov V. S.¹, Litvinko N. M.², Vorobey A. V.¹, Yurana T. M.¹, Skorostetskaya L. A.²

¹State Educational Establishment “Belarusian Medical Academy of Post-Graduate Education”, Minsk, Republic of Belarus

²Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

In the course of performing research and development work funded purpose the research created two unique, unparalleled test system adapted to an ordinary photometric equipment of clinical diagnostic laboratories of medical institutions. Their use significantly expands the possibilities of clinical application of technology research total antioxidant and leading to phospholipase activity, which is especially important for the detection of individual membrane pathology.

Keywords: membrane pathology, phospholipase, total antioxidant activity, acute necrotizing pancreatitis, the pancreas.