



СОЮЗ СОВЕТСКИХ  
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ  
РЕСПУБЛИК

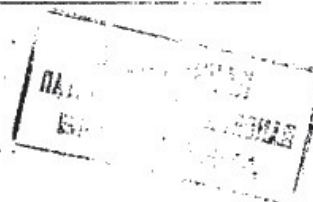
(19) SU (11) 1818586 A1

(51)5 G 01 N 33/48

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПАТЕНТНОЕ  
ВЕДОМСТВО СССР  
(ГОСПАТЕНТ СССР)

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ



1

(21) 4684155/14

(22) 25.04.89

(46) 30.05.93. Бюл. № 20

(71) Институт биохимии АН БССР и Гродненский государственный медицинский институт

(72) И.И. Степура, В.В. Спас и Н.А. Чайковская

(56) Тезисы докладов XI Международного симпозиума анестезиологов и реаниматологов соц. стран. Внутривенная общая анестезия. Методы детоксикации. Киев: 1986, с. 140-142.

(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ГЕМОСОРБЦИИ

2

(57) Изобретение относится к медицине, а именно к биохимии. Цель изобретения – повышение точности способа. Цель достигается за счет того, что в анализируемую пробу добавляют перекись водорода и соль двухвалентной меди, разбавляют плазму, проводят флуориметрическое исследование контрольной и анализируемой пробы, находят показатель соотношения интенсивности флуоресценции анализируемой и контрольной проб и при динамическом снижении показателя в пробе, взятой после гемосорбции, по сравнению с пробой до гемосорбции считают процедуру эффективной. 3 ил.

Изобретение относится к биохимии и медицине, касается определения снижения уровня эндогенной интоксикации при проведении гемосорбции и может быть использовано при проведении биохимических анализов в лабораторной медицинской практике при определении степени интоксикации после проведения детоксикационной терапии.

Цель изобретения – повышение чувствительности и специфичности способа.

На фиг.1 показаны спектры флуоресценции анализируемой пробы с плазмой крови больного, взятой до и после гемосорбции при молярном соотношении плазмы крови: перекись водорода : сульфат меди, равном 1:400:5, при длине волны возбуждающего света 330 нм; на фиг.2 – спектры флуоресценции анализируемой пробы с плазмой крови больного, взятой до и после гемосорбции при молярном соотношении

плазма крови:перекись водорода:сульфат меди, равном 1:800:5, при длине волны возбуждающего света 330 нм; на фиг.3 – спектры флуоресценции анализируемой пробы с плазмой крови больного, взятой до и после гемосорбции при молярном соотношении плазма крови : перекись водорода : сульфат меди, равном 1:3000:5, при длине волны возбуждающего света 330 нм.

Способ осуществляется следующим образом.

Производят забор крови у больного до и после гемосорбции и центрифугируют при 3000 об/мин в течение 15 мин, отделяют плазму. Отделенную плазму крови (концентрация  $10^{-3}$  М), взятую до и после гемосорбции, помещают в четыре пробирки по 100 мкл. В первые две пробирки к плазме крови, взятой до и после гемосорбции, добавляют перекись водорода и соль двухвалентной меди при молярном соотношении плазма

(19) SU (11) 1818586 A1



крови : перекись водорода : соль двухвалентной меди, равном 1:400...3000:5, а во вторые две пробирки с плазмой крови, взятой до и после гемосорбции (контроль) добавки перекиси водорода и соли двухвалентной меди не производят. Затем все четыре пробирки с пробами плазмы крови ставят на инкубацию в водяную баню при 37°C. После 30-минутной инкубации пробы, включая и контрольные, разбавляют до концентрации белков в плазме крови, равной  $10^{-6}$  М, т.е. в 1000 раз, добавляя 100 мл 0,05 М натрий-фосфатного буфера, рН 7. Разбавление пробы позволяет уменьшить объем используемой для анализа плазмы, обеспечивая при этом точное измерение последующей интенсивности флуоресценции, работая с низкой концентрацией плазмы крови (до  $10^{-6}$  М). Затем измеряют интенсивность флуоресценции проб на длине волны 390–410 нм при длине волны возбуждающего света 325–335 нм. Оценку снижения уровня эндогенной интоксикации делают по интенсивности флуоресценции, сравнивая результаты измерения флуоресценции анализируемой пробы с плазмой крови, взятой до и после гемосорбции.

В предлагаемом способе определения снижения уровня эндогенной интоксикации при проведении гемосорбции на этапе отработки оптимальных его параметров было установлено, что наилучший эффект от использования заявляемого способа регистрировался при добавлении к плазме крови перекиси водорода и соли двухвалентной меди в молярном соотношении плазма крови : перекись водорода : соль двухвалентной меди, равном 1:400...3000:5 при концентрации пробы плазмы крови  $10^{-6}$ – $10^{-3}$  М и при измерении интенсивности флуоресценции на длине волны регистрации 390–410 нм, при длине волны возбуждающего света 325–335 нм. Высший предел концентрации белков в плазме крови ( $10^{-3}$  М) обусловлен их естественной концентрацией, а нижний предел концентрации ( $10^{-6}$  М) – зоной чувствительности способа.

Избытки перекиси водорода меньше 400-кратного по отношению к белку плазмы в присутствии соли двухвалентной меди и плазмы крови не приводят к эффекту возгорания флуоресценции. А избытки перекиси водорода больше 3000-кратного по отношению к белку плазмы в присутствии соли двухвалентной меди и плазмы крови приводят к денатурации белков плазмы. Возгорание флуоресценции белков плазмы в присутствии перекиси водорода и 5-кратного избытка соли двухвалентной меди на 400 нм ( $\lambda_{\text{возб.}}=330$  нм) максимально. При избыт-

ках соли двухвалентной меди менее 5-кратного эффект возгорания флуоресценции менее значителен (в присутствии перекиси водорода). А при избытках соли двухвалентной меди более, чем 5-кратные в комплексе с перекисью водорода наблюдается деструкция белка.

Измерение флуоресценции на длине волны ниже 390 нм при длине волны возбуждающего света ниже 325 нм ведет к недостаточной интенсивности свечения, а измерение флуоресценции на длине волны выше 410 нм при длине волны возбуждающего света 335 нм не приводит к увеличению интенсивности свечения.

Ввиду того, что интервал длин волн регистрации и возбуждающего света невелик и возможность проведения измерения интенсивности флуоресценции при его граничных значениях очевидна, авторы приводят все три примера осуществления способа с наиболее оптимальными параметрами длины волны регистрации и длины волны возбуждающего света, а именно: длина волны регистрации – 400 нм, а длина волны возбуждающего света – 330 нм.

Примеры, подтверждающие возможность осуществления изобретения с получением положительного эффекта при использовании всей совокупности существенных признаков изобретения, указанной в его формуле.

**Пример 1.** Больная С., 53 года, мед. карта № 3276 поступила на стационарное лечение в Гродненскую областную клиническую больницу 24.02.88 г. с диагнозом: Состояние после аппендэктомии. Перитонит. Сепсис.

После клинико-лабораторных исследований 6-ной С. с целью детоксикации организма был проведен сеанс гемосорбции. Снижение уровня эндогенной интоксикации при проведении гемосорбции у больной определяли путем сравнения значения отношений интенсивности флуоресценции анализируемой и контрольной проб с плазмой крови, взятой до и после гемосорбции. Для этого у больной до проведения гемосорбции и последнее будет кровь (по 500 мкл). Отделяют плазму центрифугированием при 3000 об/мин в течение 15 мин. Отделенную плазму (концентрация  $10^{-3}$  М) помещают в четыре пробирки по 100 мкл в каждую. В первые две пробирки с плазмой крови больной (по 100 мкл, концентрация  $10^{-3}$  М), полученной до и после гемосорбции добавляют 5 мкл перекиси водорода, исходная концентрация 7,94 М, что соответствует молярному соотношению плазма крови : перекись водорода : сульфат меди, равному 1:400:5. Во вторые две пробирки с плазмой крови боль-



ной (по 100 мкл, концентрация  $10^{-3}$  М), полученной до и после гемосорбции (контроль) добавки перекиси водорода и сульфата меди не производят. Затем все четыре пробирки с пробами плазмы крови ставят на инкубацию в водяную баню при  $37^{\circ}\text{C}$ . Через 30 мин инкубации ко всем пробам добавляют по 100 мл натрий-сульфатного буфера, концентрацией 0,05 М, рН 7, разбавляя таким образом пробу в 1000 раз и получая при этом концентрацию белков плазмы крови в пробе, равную  $10^{-6}$  М, что позволяет уменьшить количество используемой для анализа плазмы. После разбавления проб прописывают спектры флуоресценции при длине волны возбуждающего света 330 нм.

Кривой 1<sup>I</sup> на фиг.1 показан спектр флуоресценции контрольной пробы с плазмой крови больного, взятой до гемосорбции, а кривой 1<sup>II</sup> – спектр флуоресценции контрольной пробы с плазмой крови того же больного, взятой после гемосорбции. Кривой 2<sup>I</sup> на фиг.1 показан спектр флуоресценции анализируемой пробы с плазмой крови больного, взятой до гемосорбции при молярном соотношении плазма крови : перекись водорода : сульфат меди, равном 1:400:5. Кривой 2<sup>II</sup> – спектр флуоресценции анализируемой пробы с плазмой крови того же больного, взятой после гемосорбции при молярном соотношении плазма крови : перекись водорода : сульфат меди, равном 1:400:5. Как видно из фигуры 1, по сравнению с контрольными пробами (кривые 1<sup>I</sup> и 1<sup>II</sup>) в пробах, к которым добавляли перекись водорода и сульфат меди (кривые 2<sup>I</sup> и 2<sup>II</sup>), наблюдают увеличение интенсивности флуоресценции проб. Для определения снижения уровня интоксикации у больной С. при проведении гемосорбции находят по спектрам флуоресценции на фиг.1 отношения значений интенсивности флуоресценции (в относительных единицах) анализируемой пробы к контрольной, с плазмой крови больной, взятой до и после проведения гемосорбции, при этом используют длину волны возбуждения 330 нм, а регистрацию ведут на максимуме флуоресценции – 400 нм. Значение интенсивности флуоресценции (кривая 2<sup>I</sup> фиг.1) анализируемой пробы с плазмой крови больной С., взятой до гемосорбции, равно 23,5 отн.ед., а значение интенсивности флуоресценции (кривая 1<sup>I</sup> фиг.1) контрольной пробы с плазмой крови той же больной С.; взятой также до гемосорбции, равно 5 отн.ед. Отношение найденных значений интенсивности флуоресценции анализируемой пробы к контрольной, с плазмой крови взятой до гемосорбции, равно  $\frac{23,5}{5} = 4,7$ .

Аналогичным образом находят значение интенсивности флуоресценции анализируемой пробы и контрольной с плазмой крови, взятой у той же больной С. после проведения гемосорбции. Для анализируемой пробы (кривая 2<sup>II</sup> фиг.1) это значение равно 4,8 отн.ед., а для контрольной (кривая 1<sup>II</sup> фиг.1) – 4,2 отн.ед.. Отсюда отношение найденных значений интенсивности флуоресценции анализируемой пробы и контрольной с плазмой крови, взятой у больной С. после гемосорбции, равно  $\frac{4,8}{4,2} = 1,14$ . По раз-

ности значений отношений (4,70-1,14) = 3,56) интенсивности флуоресценции анализируемой пробы и контрольной с плазмой крови, взятой у больной до и после проведения гемосорбции, судят о снижении уровня интоксикации при проведении гемосорбции.

Пример 2. Больной Г., 59 лет, мед.карта № 6541 поступил на стационарное лечение в Гродненскую областную клиническую больницу 14.04.88 г с диагнозом: Двухсторонняя пневмония. Сепсис. Токсическая энцефалопатия.

После клиничко-лабораторных исследований больному Г. с целью детоксикации организма был проведен сеанс гемосорбции. Снижение уровня эндогенной интоксикации при проведении гемосорбции у больного определяли путем сравнения значений интенсивности флуоресценции анализируемой и контрольной проб с плазмой крови, взятой до и после гемосорбции. Забор крови осуществляли аналогично, как описано в примере 1. Полученную плазму помещают в четыре пробирки по 100 мкл. В первые две пробирки с плазмой крови больного Г. (по 100 мкл концентрация  $10^{-3}$  М), полученной до и после гемосорбции добавляют 10 мкл перекиси водорода, исходная концентрация 7,94 М и 50 мкл сульфата меди, исходная концентрация  $10^{-2}$  М, что соответствует молярному соотношению плазма крови : перекись водорода : сульфат меди, равному 1:800:5. Во вторые две пробирки с плазмой крови больного (по 100 мкл концентрация  $10^{-3}$  М), полученной до и после гемосорбции (контроль), добавки перекиси водорода и сульфата меди не производят. Последующую инкубацию и разбавление проб производят аналогично, как описано в примере 1. После разбавления проб прописывают спектры их флуоресценции при длине волны возбуждающего света 330 нм.

Кривой 1<sup>I</sup> на фиг.2 показан спектр флуоресценции контрольной пробы с плазмой крови больного Г., взятой до гемосорбции, а кривой 1<sup>II</sup> – спектр флуоресценции конт-



рольной пробы с плазмой крови того же больного, взятой после гемосорбции. Кривой 2<sup>I</sup> на фиг.2 показан спектр флуоресценции анализируемой пробы с плазмой крови больного, взятой до гемосорбции при молярном соотношении плазма крови : перекись водорода : сульфат меди, равном 1:800:5. Кривой 2<sup>II</sup> – спектр флуоресценции анализируемой пробы с плазмой крови того же больного, взятой после гемосорбции при молярном соотношении плазма крови : перекись водорода : сульфат меди, равном 1:800:5. Значение интенсивности флуоресценции (кривая 2<sup>I</sup> фиг.2) анализируемой пробы с плазмой крови больного Г., взятой до гемосорбции, равно 26,5 отн.ед., а значение интенсивности флуоресценции (кривая 1<sup>I</sup> фиг.2) контрольной пробы с плазмой крови того же больного Г., взятой также до гемосорбции, равно 6,4 отн.ед. Отношение найденных значений интенсивности флуоресценции анализируемой пробы к контрольной с плазмой крови, взятой до гемосорбции, равно  $\frac{26,5}{6,4} = 4,14$ .

Аналогичным образом находят значения интенсивности флуоресценции анализируемой пробы и контрольной с плазмой крови, взятой у того же больного Г. после проведения гемосорбции. Для анализируемой пробы (кривая 2<sup>II</sup> фиг.2) это значение равно 12,5 отн.ед., а для контрольной (кривая 1<sup>II</sup> фиг.2) – 6 отн.ед. Отсюда отношение найденных значений интенсивности флуоресценции анализируемой пробы и контрольной с плазмой крови, взятой у больного Г. после гемосорбции, равно  $\frac{12,5}{6} = 2,08$ . По разности значений отношений (4,14-2,08=2,06) интенсивности флуоресценции анализируемой пробы и контрольной с плазмой крови, взятой у больного до и после проведения гемосорбции судят о снижении уровня интоксикации при проведении гемосорбции.

**П р и м е р 3.** Больной Б., 60 лет, мед. карта № 5074 поступил на стационарное лечение Гродненской области клинической больницы 22.03.88 г с диагнозом: Ревматизм, акт. II. Септический эндокардит. Аортальномитральный порок сердца. Правосторонняя пневмония. Острая почечная недостаточность.

После клинико-лабораторных исследований был проведен сеанс гемосорбции. Снижение уровня эндогенной интоксикации при проведении гемосорбции у больного определяли путем сравнения значений интенсивности флуоресценции анализируе-

мой и контрольной проб с плазмой крови, взятой до и после гемосорбции.

Забор крови осуществлялся аналогично, как описано в примере 1. Полученную плазму помещают в четыре пробирки по 100 мкл. В первые две пробирки с плазмой крови больного Б. (по 100 мкл, концентрация  $10^{-3}$  М), полученной до и после гемосорбции, добавляют 38 мкл перекиси водорода, исходная концентрация 7,94 М и 50 мкл сульфата меди, исходная концентрация  $10^{-2}$  М, что соответствует молярному соотношению плазма крови : перекись водорода : сульфат меди, равному 1:3000:5. Во вторые две пробирки с плазмой крови больного (по 100 мкл, концентрация  $10^{-3}$  М), полученной до и после гемосорбции (контроль), добавки перекиси водорода и сульфата меди не производят. Последующие инкубацию и разбавление проб производят аналогично, как описано в примере 1. После разбавления проб прописывают спектры их флуоресценции при длине волны возбуждающего света 330 нм.

Кривой 1<sup>I</sup> на фиг.3 показан спектр флуоресценции контрольной пробы с плазмой крови больного, взятой до гемосорбции, а кривой 1<sup>II</sup> – спектр флуоресценции контрольной пробы с плазмой крови того же больного, взятой после гемосорбции. Кривой 2<sup>I</sup> на фиг.3 показан спектр флуоресценции анализируемой пробы с плазмой крови больного, взятой до гемосорбции при молярном соотношении плазма крови : перекись водорода : сульфат меди, равном 1:3000:5. Кривой 2<sup>II</sup> – спектр флуоресценции анализируемой пробы с плазмой крови того же больного, взятой после гемосорбции при молярном соотношении плазма крови : перекись водорода : сульфат меди, равном 1:3000:5. Значение интенсивности флуоресценции (кривая 2<sup>I</sup> фиг.3) анализируемой пробы с плазмой крови больного Б., взятой до гемосорбции, равно 22 отн.ед., а значение интенсивности флуоресценции (кривая 1<sup>I</sup> фиг.3) контрольной пробы с плазмой крови того же больного Б., взятой также до гемосорбции, равно 7,5 отн.ед. Отношение найденных значений интенсивности флуоресценции анализируемой пробы к контрольной с плазмой крови, взятой до гемосорбции, равно  $\frac{22}{7,5} = 2,93$ .

Аналогичным образом находят значения интенсивности флуоресценции анализируемой пробы и контрольной с плазмой крови, взятой у того же больного Б. после проведения гемосорбции. Для анализируемой пробы (кривая 2<sup>II</sup> фиг.3) это значение равно 18,0 отн.ед., а для контрольной (кри-



вая 1<sup>II</sup> (фиг.3) – 6,5 отн.ед., а отсюда отношение найденных значений интенсивности флуоресценции анализируемой пробы и контрольной с плазмой крови; взятой у больного Б. после гемосорбции, равно  $\frac{18}{6,5} = 2,77$ . По разности значений отношений (2,93–2,77=0,16) интенсивности флуоресценции анализируемой пробы и контрольной с плазмой крови, взятой у больного до и после гемосорбции, судят о снижении уровня интоксикации при проведении гемосорбции.

Существенно, что добавление к плазме крови больного только одного из действующих реагентов – перекиси водорода или сульфата меди в указанных примерах молярных соотношений, не влияет на интенсивность флуоресценции в первом случае, а во втором – ведет к незначительным изменениям интенсивности флуоресценции, затрудняя произвести оценку снижения уровня интоксикации при проведении гемосорбции.

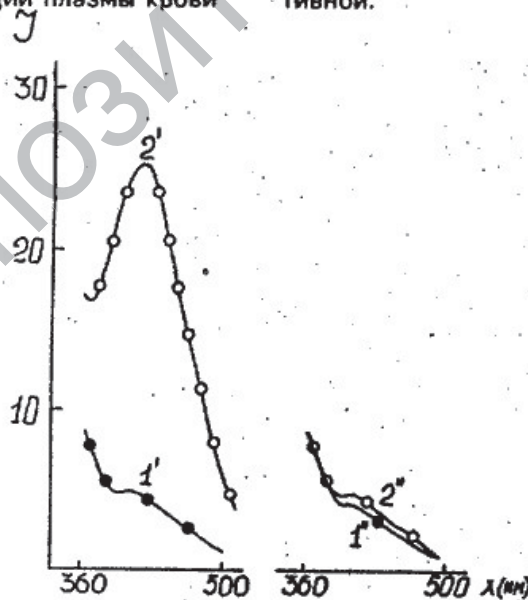
Предлагаемый способ позволяет, по сравнению с известным, снизить исходную концентрацию плазмы крови в анализируемой пробе до  $10^{-6}$  М (в прототипе используется плазма крови с концентрацией  $10^{-3}$  М), при этом обеспечивается необходимая и достаточная для регистрации интенсивность флуоресценции анализируемой пробы при возбуждении флуоресценции светом с длиной волны 325–355 нм на длине волны регистрации 390–410 нм, что свидетельствует о повышении чувствительности определения уровня интоксикации более, чем на 2 порядка. Снижение концентрации плазмы крови

в анализируемой пробе позволяет уменьшить количество используемой для анализа плазмы.

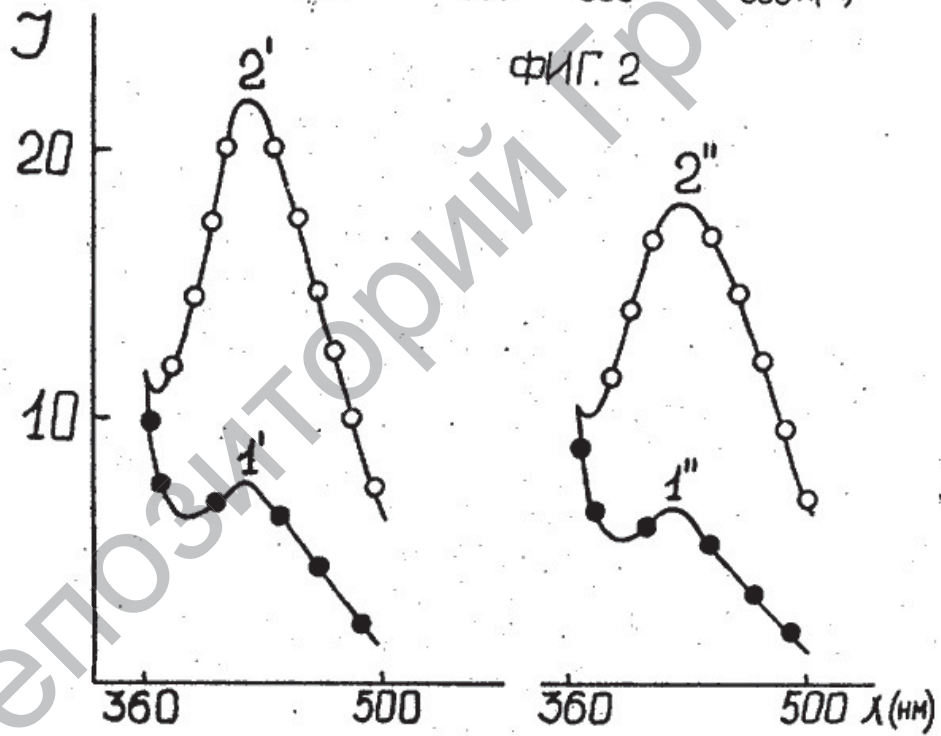
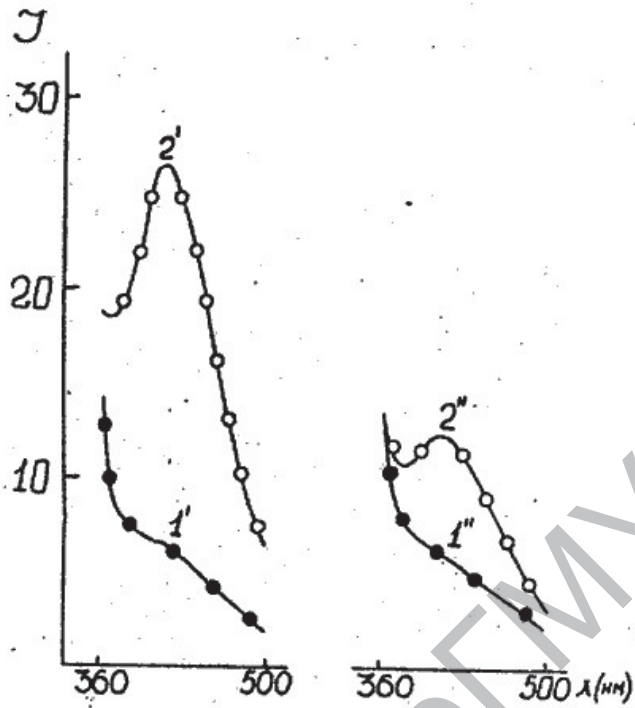
Повышение специфичности предлагаемого способа по сравнению с известным достигается за счет использования в качестве добавляемых реагентов к плазме крови перекиси водорода и соли двухвалентной меди с последующим определением уровня интоксикации в относительных единицах по интенсивности флуоресценции на длине волны 390–410 нм при длине волны возбуждающего света 325–335 нм.

#### 15 Формула изобретения

Способ определения эффективности гемосорбции, включающий забор крови до и после проведения гемосорбции, выделение плазмы центрифугированием с последующим спектрофотометрическим исследованием анализируемой и контрольной пробы, отличающийся тем, что, с целью повышения точности способа, после выделения плазмы в анализируемую пробу добавляют перекись водорода и соль двухвалентной меди при молярном соотношении 1:400–3000:5, разбавляют плазму в 10–1000 раз, проводят флуориметрическое исследование контрольной и анализируемой проб при длине волны 390–410 нм, находят показатель соотношения интенсивности флуоресценции анализируемой и контрольной проб и при динамическом снижении показателя в пробе, взятой после гемосорбции, по сравнению с пробой до гемосорбции считают процедуру эффективной.



ФИГ. 1



ФИГ. 2

ФИГ. 3

Редактор Л.Волкова

Составитель И.Степура  
Техред М.Моргентал

Корректор Н.Король

Заказ 1936

Тираж

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР  
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., 4/5

Производственно-издательский комбинат "Патент", г. Ужгород, ул. Гагарина, 101