

**ОПИСАНИЕ
ИЗОБРЕТЕНИЯ
К ПАТЕНТУ**
(12)

РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ



НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ
СОБСТВЕННОСТИ

(19) **ВУ** (11) **6135**
(13) **С1**
(51)⁷ **G 01N 33/48**

(54) **СПОСОБ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ИНДИВИДУАЛЬНОЙ
ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К АЛКОГОЛЬНОМУ ПОРАЖЕНИЮ
ПЕЧЕНИ**

(21) Номер заявки: а 19990478

(22) 1999.05.11

(46) 2004.06.30

(71) Заявители: Государственное научное учреждение "Институт биохимии Национальной академии наук Беларуси"; Государственное высшее учебное учреждение "Гродненский государственный медицинский университет" (ВУ)

(72) Авторы: Бушма Татьяна Васильевна; Зиматкин Сергей Михайлович; Бушма Михаил Иванович; Легонькова Людмила Федоровна; Слышенок Вячеслав Степанович (ВУ)

(73) Патентообладатели: Государственное научное учреждение "Институт биохимии Национальной академии наук Беларуси"; Государственное высшее учебное учреждение "Гродненский государственный медицинский университет" (ВУ)

(57)

Способ прогнозирования индивидуальной предрасположенности к алкогольному поражению печени путем анализа, по меньшей мере, одного из биомаркеров в образце гомогената печени, при этом в качестве биомаркеров используют уровень малонового диальдегида, содержание восстановленного глутатиона и скорость окисления никотинамидадениндинуклеотида восстановленного, которые сравнивают с соответствующими им усредненными значениями, и в случае увеличения уровня малонового диальдегида не менее чем на 28 %, уменьшения содержания восстановленного глутатиона не менее чем на 29 % и снижения скорости окисления никотинамидадениндинуклеотида восстановленного не менее чем на 19 % прогнозируют предрасположенность к алкогольному поражению печени.

(56)

CHAN YEUNG M. et al. Am. J. Clin. Pathol. 1981. V. 75. - P. 320.

SU 1627991 A1, 1991.

SU 1397834 A1, 1998.

SU 1559294 A1, 1990.

ВУ 2736 С2, 1999.

Изобретение относится к области медицины и может использоваться для прогнозирования индивидуальной предрасположенности к алкогольному поражению печени.

Анализ уровня техники в этой области показывает, что на сегодняшний день нет способа, позволяющего прогнозировать степень тяжести, характер и выраженность последующего алкогольного поражения здоровой печени.

BY 6135 C1

Задачей, на решение которой направлено изобретение, является установление взаимосвязей между особенностями метаболизма здоровой печени и степенью тяжести, характером и выраженностью последующего ее алкогольного поражения.

Поставленная задача решается путем анализа, по меньшей мере, одного из биомаркеров в образце гомогената печени. При этом в качестве биомаркеров используют уровень малонового диальдегида, содержание восстановленного глутатиона и скорость окисления никотинамидадениндинуклеотида восстановленного (NADH), которые сравнивают с соответствующими им усредненными значениями, и в случае увеличения уровня малонового диальдегида не менее чем на 28 %, уменьшения содержания восстановленного глутатиона не менее чем на 29 % и снижения скорости окисления никотинамидадениндинуклеотида восстановленного не менее чем на 19 % прогнозируют предрасположенность к алкогольному поражению печени.

Способ осуществляют следующим образом. Исследуют образцы печени на уровень процессов перекисного окисления липидов, антиоксидантного потенциала и скорости окисления NADH. Уровень процессов перекисного окисления липидов оценивают по содержанию малонового диальдегида (МДА). МДА в образце определяют по цветному комплексу с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК), дающему максимум поглощения при 532 нм с молярным коэффициентом экстинкции $1,56 \times 10^5 \text{ см}^{-1} \times \text{M}^{-1}$. Реакцию проводят в 0,025 М трис-НСl буфере (pH 7,4), содержащем 0,175 М хлорида калия. МДА определяют без и при ферментативной ADP/Fe/NADPH (2 мМ/20 мкМ/0,3 мМ), неферментативной ADP/Fe/аскорбат (2 мМ/20 мкМ/0,2 мМ) индукции свободных радикалов в образце при инкубации в течение 15 минут (37 °C). Затем добавляют трихлоруксусную кислоту и центрифугируют. К 800 мкл супернатанта добавляют раствор ТБК и, для развития окраски, пробы помещают на 10 минут в кипящую водяную баню. В качестве нулевой пробы используют образцы, содержащие только буферный раствор.

Уровень антиоксидантного потенциала оценивают по содержанию восстановленного глутатиона. В основе метода определения содержания восстановленного глутатиона лежит реакция взаимодействия SH-групп глутатиона с 5,5-дитиобис-2-нитробензойной кислотой (ДТНБ) с образованием 2-нитро-5-меркаптобензойной кислоты. 100 мг образца гомогенизируют с 900 мкл 10 % ТХУ и 900 мкл 0,2 М калий-фосфатного буфера, содержащего 0,005 М ЭДТА, pH 7,6. Гомогенат центрифугируют 10 минут при 3000 об/мин. К 800 мкл центрифугата добавляют 1,6 мл 0,2 М калий-фосфатного буфера с 0,005 М ЭДТА и 100 мкл 0,01 М ДТНБ и через 5 минут спектрофотометрируют при $\lambda = 412 \text{ нм}$ с контрольной пробой, не содержащей гомогената образца. Расчет производят в ммоль/г образца.

Для определения скорости окисления NADH составляют инкубационную смесь, содержащую 0,6-0,8 мг белка образца и 33 мкМ NADH в 100 мМ трис-НСl буфере (pH 7,4). Регистрируют скорость убыли NADH при длине волны 340 нм. Измерение производят в термостатируемой кювете с длиной оптического пути 1 см на спектрофотометре "Specord UV VIS" (Германия) в течение 1-3 минут при 30 °C (80-100 % пропускания). Реакцию начинают добавлением NADH. При расчетах используют коэффициент молярной экстинкции для NADH, равный $6,6 \times 10^3 \text{ см}^{-1} \text{M}^{-1}$.

Для всех исследуемых показателей были установлены усредненные величины данных каждого из биомаркеров согласно собственным данным, полученным при исследовании 96 образцов в соответствии с изложенными ниже примерами. Они характеризуют средние их величины для индивидуума. Установление зависимости отклонения в ту или иную сторону от усредненного значения для каждого из биомаркеров и степени предрасположенности к последующему алкогольному поражению печени производили путем введения этанола в дозе 5 г/кг (в виде 30 % водного раствора) 96 исследуемым крысам (в желудок через металлический зонд в течение 57 дней, 1 раз в день, ежедневно) и сравнения степени

BY 6135 C1

поражения печени в конце эксперимента с изначальными данными по биомаркерам. В результате выведены зависимости уровня отклонений в ту или иную сторону каждого из биомаркеров и бальной оценки степени последующего алкогольного поражения печени.

Пример 1.

Определяют скорость окисления NADH. Берут образец, содержащий 0,6-0,8 мг белка, и воздействуют на него NADH. Регистрируют скорость убыли NADH из образца. Средние значения скорости окисления NADH составляют 1,58 нмоль/мин/мг белка (данные получены на основании исследования 96 образцов), что соответствует и литературным данным. Для данного исследования поражение печени характеризуется в основном вакуолизацией гепатоцитов. Прогноз базируется на основании данных табл. 1.

Таблица 1

Взаимосвязь между скоростью окисления NADH (до воздействия этанолом) и степенью вакуолизации гепатоцитов (после воздействия этанолом)

Окисление NADH до воздействия этанолом (нмоль/мин/мг)	%	Вакуолизация гепатоцитов после воздействия этанолом (в баллах)	Состояние печени (общая оценка)
2,63	166	0,20	Минимальное поражение
1,58 (среднее значение)	100	0,74	Средняя степень поражения
1,28	81	1,00	Нарастание степени поражения печени
1,04	66	1,50	
0,93	59	2,50	
0,80	51	3,00	

Как показывают данные, представленные в табл. 1, при снижении скорости окисления NADH на 19 % (с 1,58 - среднее значение до 1,28 нмоль/мин/мг) степень вакуолизации гепатоцитов увеличивается на 36 %. При дальнейшем снижении скорости окисления NADH на 34 % степень вакуолизации гепатоцитов значительно возрастает и превышает усредненные значения более чем в 2 раза. Здесь и в последующих примерах средняя степень поражения печени отражает обычную реакцию индивидуумов в ответ на действие этанола и не приводит к существенным нарушениям (в последующем) ее функции. Нарастание степени поражения печени характеризуется повышенной чувствительностью органа к повреждающему действию на него этанола.

Таким образом, данные табл. 1 свидетельствуют о том, что при достижении значений скорости окисления NADH 66 % (с 1,58 - среднее значение до 1,04 и менее) индивидуум характеризуется предрасположенностью к возможным алкогольным поражениям печени. Результаты исследований, представленных в таблице 1, подтверждаются также данными корреляционного анализа, проведенного между скоростью окисления NADH (до воздействия этанолом), с одной стороны, и степенью выраженности вакуолизации гепатоцитов (после воздействия этанолом), с другой стороны, проведенных в образцах одних и тех же 96 индивидуумов. Установлено, что между скоростью окисления NADH и вакуолизацией гепатоцитов существует тесная отрицательная корреляционная взаимосвязь. Коэффициент корреляции при этом составляет -0,69 ($p < 0,05$).

Пример 2.

Для определения состояния антиоксидантной системы мы использовали содержание восстановленного глутатиона. Среднее значение восстановленного глутатиона составляет 3,51 мкмоль/г, согласно собственным исследованиям, что соответствует и литературным данным. Для данного исследования поражение печени характеризуется в основном жировой инфильтрацией паренхимы. Прогноз базируется на основании данных табл. 2.

Взаимосвязь между содержанием восстановленного глутатиона до воздействия этанолом и степенью выраженности жировой инфильтрации паренхимы после воздействия этанолом

Восстановленный глутатион до воздействия этанолом (мкмоль/г)	%	Жировая инфильтрация паренхимы печени после воздействия этанолом (в баллах)	Состояние печени (общая оценка)
6,63	189	0,20	Минимальное поражение
3,51 (среднее значение)	100	0,94	Средняя степень поражения
3,08	88	1,00	
2,97	85	1,35	
2,48	71	1,50	Нарастание степени поражения печени
2,30	66	2,30	

Как показывают данные, при снижении содержания восстановленного глутатиона на 12 % (с 3,51 - средняя величина до 3,08 мкмоль/г) степень жировой инфильтрации паренхимы печени возрастает незначительно (на 6 %). Дальнейшее его снижение (на 15 %) приводит к увеличению степени жировой инфильтрации паренхимы печени с 0,94 до 1,35 баллов. Снижение содержания восстановленного глутатиона на 29 % приводит к увеличению степени жировой инфильтрации паренхимы печени на 60 %.

Таким образом, анализ данных, представленных в табл. 2, свидетельствует о том, что при достижении значений уровня восстановленного глутатиона 71 % и менее от средней величины индивидуум характеризуется предрасположенностью к возможным последующим алкогольным поражениям печени.

Данные табл. 2 подтверждаются также и результатами корреляционного анализа. Установлено, что между содержанием восстановленного (до воздействия этанолом) и выраженностью жировой инфильтрации паренхимы (после воздействия этанолом) существует тесная обратная взаимосвязь с высоким коэффициентом (-0,71; $p < 0,05$).

Пример 3.

Для определения уровня перекисного окисления липидов (ПОЛ) мы использовали содержание малонового диальдегида (МДА). Средние значения МДА составляют 0,22 нмоль/мг (данные получены на основании исследования 96 образцов). МДА ассоциируется в основном с деструкцией и гибелью гепатоцитов. Для средних значений МДА (0,22 нмоль/мг) прогноз в плане предрасположенности к возможным последующим алкогольным поражениям печени будет нормальным. При этих значениях МДА деструкция и гибель гепатоцитов, характеризующие поражение печени, будут соответствовать 1,14 баллов. Чем выше балл, тем более выраженное поражение печени и наоборот: снижение величины балла свидетельствуют о меньшей степени поражения органа. Отклонение от заявленной средней величины МДА в сторону ее увеличения ведет к поражению печени, что подтверждается экспериментальными данными при воздействии на животных, у которых были различные исходные показатели МДА. Прогноз базируется на основании данных, представленных в табл. 3.

Взаимосвязь между содержанием МДА (до воздействия этанолом) и деструкцией, гибелью гепатоцитов (после воздействия этанолом)

Содержание МДА до воздействия этанолом (нмоль/мг)	%	Деструкция и гибель гепатоцитов после воздействия этанолом (в баллах)	Состояние печени (общая оценка)
0,13	59	0,33	Минимальное поражение
0,22 (среднее значение)	100	1,14	Средняя степень поражения
0,24	109	1,33	Нарастание степени поражения печени
0,25	114	1,33	
0,27	128	2,00	
0,30	136	3,00	

Как следует из данных табл. 3, между увеличением содержания МДА в образце интактных индивидуумов (до воздействия этанолом) и выраженностью деструкции и гибели гепатоцитов у этих же индивидуумов после воздействия этанолом) существует тесная взаимосвязь. Так, при увеличении содержания МДА на 14 % (с 0,22 до 0,25 нмоль/мг) степень деструкции и гибели гепатоцитов увеличивается на 17 %. При увеличении уровня МДА на 28 % с 0,22 (среднее значение) до 0,28 степень деструкции и гибели гепатоцитов возрастает на 75 % (с 1,14 - среднее значение до 2,00 баллов). Данные табл. 3 подтверждаются также и результатами корреляционного и регрессионного анализов, проведенных между содержанием МДА до воздействия этанолом (с одной стороны) и выраженностью деструкции и гибели гепатоцитов после воздействия этанолом (с другой стороны) в одних и тех же образцах 96 индивидуумов. Установлено существование тесной положительной корреляционной взаимосвязи между содержанием МДА и степенью деструкции и гибели гепатоцитов. Коэффициент корреляции при этом составил +0,52, что при большой выборке (96 образцов) является достоверным ($p < 0,05$). Результаты регрессионного анализа свидетельствуют о том, что между содержанием МДА, скоростью его образования в неферментативных и ферментативных реакциях в образцах индивидуумов (до воздействия этанолом) и степенью деструкции и гибели гепатоцитов (после воздействия этанолом) существует взаимосвязь, которая описывается уравнением нелинейной множественной регрессии.

Как показывают данные табл. 3, при превышении процессов ПОЛ (судя по значениям МДА) на 28 % и выше усредненной величины индивидуум характеризуется предрасположенностью к последующим возможным алкогольным поражениям печени.

Таким образом, при применении каждого из биомаркеров в отдельности выявляется предрасположенность к отдельным проявлениям гепатотоксического действия этанола, которая сама по себе дает прогнозную характеристику последующего алкогольного поражения печени и его качественных морфологических проявлений. Однако наиболее полную и объективную информацию о степени риска развития, в последующем, алкогольного поражения печени можно получить при использовании всех трех выше приведенных биомаркеров.

Установление степени предрасположенности индивидуума к последующему возможному алкогольному повреждению печени позволит осуществить принятие профессиональных шагов по недопущению наступления прогнозируемых нежелательных последствий, с одной стороны, и, в случае обнадеживающего результата, продолжать вести обычный образ жизни - с другой.