

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **018686**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2013.09.30

(51) Int. Cl. **G01N 33/483** (2006.01)
G01N 21/76 (2006.01)

(21) Номер заявки
201200925

(22) Дата подачи заявки
2012.07.04

(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ТКАНИ И ПРИМЕНЕНИЕ ЭТОГО СПОСОБА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЕЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ И/ИЛИ СТЕПЕНИ НЕКРОТИЗАЦИИ

(43) **2013.09.30**

(96) **2012000149 (RU) 2012.07.04**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
"ДИСофт" (RU)**

(56) Матвеева Н.С. и др. Активированная люцегенином хемилюминесценция тканей животных. БИОФИЗИКА, 2007, том 52, вып.6, с. 1120-1127, реферат, с. 1122-1123, рис. 1
Владимиров Ю.А. и др. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция. Успехи биологической химии, т. 49, 2009, с. 364-372, 376

(72) Изобретатель:
**Измайлов Дмитрий Юрьевич,
Владимиров Юрий Андреевич,
Полимова Анастасия Михайловна
(RU)**

RU-C1-2408019
RU-C2-2389020
RU-C2-2289138
US-A1-20100221767

(74) Представитель:
Михайлов А.В. (RU)

(57) Изобретение относится к области медицины, биологии, фармакологии, токсикологии. Предложен способ определения функционального состояния биологической ткани, в котором образец упомянутой ткани инкубируют при физиологически приемлемых условиях в среде, содержащей активатор хемилюминесценции, аэрируют среду с упомянутым образцом кислородсодержащей газовой смесью с разной интенсивностью, упомянутый образец фотометрируют, а функциональное состояние биологической ткани определяют по изменению интенсивности свечения при разной интенсивности аэрации. Технический результат - повышение точности определения функционального состояния тканей.

B1

018686

**018686
B1**

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к области медицины, биологии, фармакологии, токсикологии и может быть использовано для определения функционального состояния биологической ткани, в частности для определения ее жизнеспособности и/или степени некротизации.

Предшествующий уровень техники

До настоящего времени ни один из методов определения жизнеспособности биологических тканей не нашел широкого применения в практике. Главными причинами этого являются недостаточная точность существующих методов, дороговизна используемого оборудования, косвенный характер получаемых результатов, а также длительность исследований.

В хирургической практике основным способом определения жизнеспособности органов и тканей является визуальная оценка по цвету, консистенции, кровенаполнению и другим параметрам. В частности, известен способ определения жизнеспособности кишки, основанный на визуальной оценке цвета серозной оболочки, пульсации брыжеечных сосудов и перистальтики кишечной петли (патент РФ № 2043750).

В последнее время появляются способы определения жизнеспособности, основанные на изменении физико-химических свойств биологических тканей. Известны способы определения жизнеспособности нервной и мышечной ткани посредством измерения межэлектродного электрического сопротивления (импеданса), изменяющегося при повреждении ткани (патенты РФ № 2103914 и 2161307 соответственно).

Известен способ определения жизнеспособности тканей сердца посредством измерения индуцированной лазерным излучением флуоресценции, который позволяет оценить снижение содержания флуоресцирующих веществ при повреждении ткани (патент РФ № 2181486).

Существующие способы определения жизнеспособности биологических тканей основаны на выявлении изменений в клеточной структуре или в химическом составе тканей. Однако такие изменения всегда являются следствием функциональных нарушений, т.е. являются вторичными. Снижение жизнеспособности биологической ткани начинается с нарушения функций клеток, но при этом еще не происходит нарушения структуры и состава ткани. Невысокая точность существующих способов связана с тем, что они не позволяют определить начальные этапы функциональных нарушений и снижения жизнеспособности ткани.

Целью настоящего изобретения является преодоление вышеописанных недостатков известных способов и повышение точности определения сохранности биологических тканей.

Сущность изобретения

Задача изобретения состоит в создании экспрессного и несложного в реализации способа определения функционального состояния биологической ткани, свободного от влияния субъективных факторов.

Технический результат состоит в повышении точности определения функционального состояния тканей.

Поставленная задача решена благодаря тому, что в способе определения функционального состояния биологической ткани согласно настоящему изобретению образец упомянутой ткани инкубируют при физиологически приемлемых условиях в среде, содержащей активатор хемилуминесценции, аэрируют среду с упомянутым образцом кислородсодержащей газовой смесью с разной интенсивностью, упомянутый образец фотометрируют, а функциональное состояние биологической ткани определяют по изменению интенсивности свечения при разной интенсивности аэрации.

Как будет понятно среднему специалисту в данной области техники, повышение точности измерений в способе по изобретению по сравнению с аналогами обеспечивается главным образом благодаря тому, что вместо широко применяющихся косвенных показателей функционального состояния тканей и клеток предлагаемый способ направлен на измерение показателей активности процессов утилизации клетками кислорода, которые являются наиболее достоверными индикаторами их состояния.

В одном из частных вариантов осуществления среду с упомянутым образцом аэрируют с постоянной интенсивностью, затем на предварительно заданный период времени (анаэробный период) полностью прекращают аэрацию, после чего возобновляют аэрацию с прежней интенсивностью.

В еще одном частном варианте осуществления среду с упомянутым образцом аэрируют с постоянной интенсивностью, затем на предварительно заданный период времени (анаэробный период) уменьшают интенсивность аэрации, после чего возобновляют аэрацию с прежней интенсивностью. О функциональной активности клеток в исследуемом образце ткани судят по изменению интенсивности свечения образца в анаэробном периоде (утилизация кислорода живыми клетками в анаэробном периоде резко уменьшается, чему соответствует провал на фотометрической кривой).

В другом частном варианте осуществления среду с упомянутым образцом аэрируют с постоянной интенсивностью, затем на предварительно заданный период времени (анаэробный период) уменьшают интенсивность аэрации, после чего возобновляют аэрацию с прежней интенсивностью и вновь повторяют описанную операцию по меньшей мере один раз с уменьшением интенсивности аэрации в анаэробном периоде на предварительно заданную величину при каждом повторе.

В предпочтительном варианте осуществления вышеописанную операцию (процедуру) повторяют,

по существу, до тех пор, пока сохраняется влияние аэрации на интенсивность свечения упомянутого образца (до полной гибели тканей).

В соответствии со способом по изобретению аэрацию предпочтительно осуществляют воздухом, смесью кислорода и инертного газа или смесью кислорода, инертного газа и 1-5 об.% диоксида углерода.

В качестве активатора хемилюминесценции предпочтительно используют вещество с высокой специфичностью к супероксидным радикалам, хорошо проникающее через клеточные мембраны и избирательно накапливающееся в областях с отрицательным электрическим зарядом.

В одном из наиболее предпочтительных вариантов активатор хемилюминесценции представляет собой люцигенин.

В предпочтительном варианте осуществления, в качестве образца сравнения используют среду, содержащую активатор хемилюминесценции без образца ткани.

В еще более предпочтительном варианте осуществления в качестве образца сравнения используют среду, содержащую активатор хемилюминесценции с образцом полностью некротизированной ткани.

Фотометрию в соответствии со способом по изобретению могут осуществлять посредством фотометра, флуориметра, спектрофотометра, спектрофлуориметра или хемилюцинометра.

Для исключения влияния температурных колебаний на интенсивность свечения при осуществлении фотометрии среду с образцом желательнее термостатировать.

Вышеупомянутый технический результат достигается при использовании вышеописанного способа для определения жизнеспособности тканей, когда осуществляют фотометрию образца интактной и частично некротизированной ткани, а если разность скоростей убывания интенсивности свечения упомянутых образцов в анаэробные периоды превышает предварительно заданную величину, образец частично некротизированной ткани считают нежизнеспособным.

Вышеупомянутый технический результат также достигается при использовании вышеописанного способа для определения степени некротизации тканей, когда осуществляют фотометрию образца интактной и частично некротизированной ткани, а разность скоростей убывания интенсивности свечения упомянутых образцов в анаэробные периоды используют в качестве показателя степени некротизации образца частично некротизированной ткани.

Предлагаемый способ может быть использован для оценки жизнеспособности органов и тканей при хирургических операциях и трансплантациях, а также для оценки влияния различных факторов (фармакологических, токсических и др.) на функциональное состояние клеточных структур.

Перечень фигур

На фиг. 1 представлена схема осуществления способа, где (1) - исследуемый материал, (2) - среда инкубации, (3) - трубка для подачи воздуха, (4) - фоточувствительный элемент; на фиг. 2 показано влияние аэрации на интенсивность (I) свечения исследуемого материала; стрелками указаны моменты изменения интенсивности аэрации, цифрами указаны значения интенсивности аэрации (гpm); на фиг. 3 показано влияние ингибитора дыхательной цепи митохондрий на интенсивность (I) свечения исследуемого материала, где (1) - инкубация без ингибитора, (2) - инкубация с ингибитором; на фиг. 4 показано влияние длительности анаэробной инкубации исследуемого материала на интеграл интенсивности свечения (S).

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения

Как описано выше, предлагаемый способ определения функционального состояния и жизнеспособности биологической ткани заключается в регистрации свечения исследуемого материала при его инкубации в физиологической среде, содержащей активатор хемилюминесценции, при аэрации этой среды кислородсодержащей газовой смесью.

Способ осуществляется следующим образом.

Выполняют забор материала. В качестве исследуемого материала могут быть использованы биоптаты (кусочки) тканей и органов, полученные хирургическим путем, участки трансплантируемых органов, культивируемые клеточные культуры и др. Затем, как показано на фиг. 1, исследуемый материал в физиологически приемлемых условиях инкубируют в среде, содержащей активатор хемилюминесценции, т.е. вещество, излучающее квант электромагнитного излучения при взаимодействии со свободными радикалами и обладающее высоким квантовым выходом. Наибольшей информативностью обладают результаты, полученные с высокоспецифичными к супероксидным радикалам активаторами, легко проникающими через клеточные мембраны и преимущественно накапливающимися в областях с отрицательным электрическим зарядом. В качестве одного из таких активаторов может быть использован люцигенин (нитрат бис-N-метилакридиния). Среду с образцом аэрируют кислородсодержащей газовой смесью. Для этого в среду погружают трубку, через которую подают воздух или другую кислородсодержащую газовую смесь от насоса или любого другого подобного устройства. При этом избегают прямого контакта исследуемого образца с пузырьками воздуха на конце трубки. Стараются добиться умеренной интенсивности аэрации и обеспечить постоянный уровень насыщения среды инкубации кислородом. Фотометрию образца осуществляют с помощью фотоприемного устройства при постоянной аэрации. В качестве аналитического параметра могут использовать интенсивность свечения и/или интеграл интенсивности свечения (светосумму).

Вышеописанный способ основан на регистрации хемилюминесценции, вызванной химическими реакциями свободных радикалов, образующихся в митохондриях живых клеток. Как известно, митохондрии представляют собой специализированные органеллы, выполняющие функцию преобразования энергии химических связей различных субстратов в энергию фосфодиэфирной связи АТФ при их окислении кислородом. Поскольку нарушение работы митохондрий приводит к быстрой гибели клеток, их функционирование является надежным показателем жизнеспособности ткани в целом.

Окисление различных химических субстратов, локализованное на внутренней мембране митохондрии, сопровождается переносом электронов. В процессе окислительного фосфорилирования часть электронов выходит из дыхательной цепи и вместе с молекулярным кислородом образует супероксид анион-радикалы (САР). Появление свободных радикалов, в том числе САР, можно детектировать с помощью светочувствительной аппаратуры, так как часть энергии неспаренных электронов в свободных радикалах растрачивается на излучение кванта света. Таким образом, функциональное состояние клеток и тканей можно определять по уровню свечения, связанного с генерацией свободных радикалов в митохондриях.

Однако образование свободных радикалов происходит не только в митохондриях, но и в других частях клетки, а также во внеклеточном пространстве. Свободные радикалы могут образовываться в реакциях с участием пероксида водорода и оксида азота (II) и при окислении липидов клеточных мембран. Фагоцитарные клетки также способны генерировать свободные радикалы для нейтрализации чужеродных объектов. Определение уровня САР непосредственно в митохондриях осложняется разнообразием форм и источников свободных радикалов в живой ткани.

Для направленного определения интенсивности образования свободных радикалов внутри клетки или в отдельных компартментах клетки в способе по изобретению предлагается использовать активаторы хемилюминесценции. Активаторы хемилюминесценции усиливают интенсивность свечения при взаимодействии со свободными радикалами. При этом предпочтительно, когда активатор удовлетворяет следующим требованиям: во-первых, обладает хорошей проницаемостью через клеточные мембраны, чтобы проникать в клетку и в митохондрии; во-вторых, обладает преимущественным накоплением в области с отрицательным электрическим зарядом, т.е. на внутренней мембране митохондрий; в-третьих, обладает высокой специфичностью к САР, чтобы усиливать свечение, связанное с генерацией именно этих радикалов. Всем этим требованиям удовлетворяет, в частности, нитрат бис-N-метилакридиния (люцигенин). Люцигенин избирательно усиливает свечение, связанное с генерацией САР в функциональных митохондриях.

Для нормального функционирования клеток при осуществлении предлагаемого способа обеспечивают физиологические условия среды инкубации. К этим физиологическим условиям относится состав среды, обеспечивающий жизнедеятельность клеток, и физические факторы, такие как температура и давление. Кроме того, для поддержания функционального состояния ткани при осуществлении способа обеспечивают постоянный уровень содержания кислорода в среде инкубации. Живые клетки являются активным потребителем кислорода, так как процесс окислительного фосфорилирования в митохондриях протекает только при постоянном поступлении кислорода в клетки. При извлечении участка ткани из живого организма поступление кислорода в ткань прекращается и наступает состояние гипоксии, характеризующееся остановкой процесса окислительного фосфорилирования в митохондриях. При помещении извлеченного участка ткани в среду инкубации процесс окислительного фосфорилирования временно возобновляется за счет потребления растворенного в среде инкубации кислорода. Для обеспечения полноценного функционирования биологической ткани необходимо поддерживать постоянный уровень содержания кислорода в среде инкубации путем аэрации воздухом или кислородсодержащей газовой смесью.

Пример 1. Определение прогностической способности способа по изобретению.

Для определения прогностической способности способа по изобретению изучают свечение кусочков биологической ткани при инкубации в физиологической среде с активатором хемилюминесценции люцигенином и аэрации этой среды воздухом. Схема проведения исследований показана на фиг. 1. В качестве исследуемого материала (1) используют кусочки печени и срезы мозга лабораторных мышей. Исследуемый материал сразу после выделения из организма животного помещают в кювету со средой инкубации (2), включающей раствор Хенкса с глюкозой (для кусочков печени) или раствор Кребса-Рингера (для срезов мозга), а также активатор хемилюминесценции люцигенин в концентрации 60 мкМ. Емкости со средой и образцами термостатируют при температуре 37°C. Для осуществления постоянной аэрации среды инкубации в кювету опускают тонкую трубку (3), через которую подают воздух с помощью перистальтического насоса. Свечение исследуемого материала регистрируют посредством хемилюминометра (4).

Как показано на фиг. 2, аэрация среды инкубации приводит к появлению интенсивного свечения исследуемого материала. Через 10-15 мин после начала аэрации интенсивность свечения выходит на максимальный уровень. Постепенный рост интенсивности свечения в начале инкубации связан с проникновением активатора хемилюминесценции в клетки и в митохондрии. В дальнейшем при прекращении аэрации интенсивность свечения стремительно падает до начального фонового уровня, а при возобновлении аэрации интенсивность свечения также стремительно возрастает до прежних значений. Таким

образом, свечение биологической ткани возможно только в присутствии кислорода и требует постоянной аэрации среды инкубации. Однако увеличение интенсивности аэрации в 4 раза (окружную частоту вращения ротора перистальтического насоса увеличивают с 5 до 20 rpm) приводит к незначительному увеличению интенсивности свечения на 20-30%. Это связано с тем, что интенсивность свечения в большей степени зависит от скорости потребления кислорода биологической тканью, чем от абсолютного содержания кислорода в среде инкубации.

Пример 2.

Для выявления вклада митохондрий в кислородзависимое свечение биологической ткани проводят эксперименты по методике примера 1 с использованием ингибиторов дыхательной цепи митохондрий, в частности 2,4-динитрофенола и ротенона.

Как показано на фиг. 3, ингибиторы дыхательной цепи митохондрий подавляют интенсивность свечения на 80% и более. Таким образом, кислородзависимое свечение биологической ткани определяется функциональным состоянием митохондрий.

Пример 3.

Для определения жизнеспособности биологической ткани изучают влияние длительности предварительной инкубации в бескислородных (анаэробных) условиях на светосумму, т.е. интеграл интенсивности свечения.

Как показано на фиг. 4, светосумма свечения снижается пропорционально длительности анаэробной инкубации. Снижение светосуммы при анаэробной инкубации связано с нарушением функций митохондрий и снижением жизнеспособности биологической ткани, вызванных длительным отсутствием кислорода.

Таким образом, предлагаемый способ позволяет достоверно определить функциональное состояние митохондрий клеток, активность которых является надежным показателем их (клеток) жизнеспособности. Предлагаемый способ позволяет быстро определять функциональное состояние биологической ткани, не требует применения сложных методов химического и морфологического анализа.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ определения функционального состояния биологической ткани, в котором образец упомянутой ткани инкубируют при физиологически приемлемых условиях в среде, содержащей активатор хемилюминесценции, аэрируют среду с упомянутым образцом кислородсодержащей газовой смеси с разной интенсивностью, упомянутый образец фотометрируют, а функциональное состояние биологической ткани определяют по изменению интенсивности свечения при разной интенсивности аэрации.

2. Способ по п.1, в котором среду с упомянутым образцом аэрируют с постоянной интенсивностью, затем на предварительно заданный период времени полностью прекращают аэрацию, после чего возобновляют аэрацию с прежней интенсивностью.

3. Способ по п.1, в котором среду с упомянутым образцом аэрируют с постоянной интенсивностью, затем на предварительно заданный период времени уменьшают интенсивность аэрации, после чего возобновляют аэрацию с прежней интенсивностью.

4. Способ по п.1, в котором среду с упомянутым образцом аэрируют с постоянной интенсивностью, затем на предварительно заданный период времени уменьшают интенсивность аэрации, после чего возобновляют аэрацию с прежней интенсивностью и вновь повторяют описанную операцию по меньшей мере один раз с уменьшением интенсивности аэрации в анаэробном периоде на предварительно заданную величину при каждом повторе.

5. Способ по п.4, в котором операцию повторяют, по существу, до тех пор, пока сохраняется влияние аэрации на интенсивность свечения упомянутого образца.

6. Способ по п.1, в котором аэрацию осуществляют воздухом, смесью кислорода и инертного газа или смесью кислорода, инертного газа и 1-5 об.% диоксида углерода.

7. Способ по п.1, в котором в качестве активатора хемилюминесценции используют вещество с высокой специфичностью к супероксидным радикалам, хорошо проникающее через клеточные мембраны и избирательно накапливающееся в областях с отрицательным электрическим зарядом.

8. Способ по п.7, в котором активатор хемилюминесценции представляет собой люцигенин.

9. Способ по п.1, в котором в качестве образца сравнения используют среду, содержащую активатор хемилюминесценции без образца ткани.

10. Способ по п.1, в котором в качестве образца сравнения используют среду, содержащую активатор хемилюминесценции, с образцом полностью некротизированной ткани.

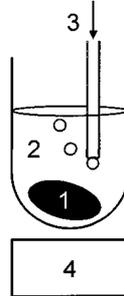
11. Способ по п.1, в котором фотометрию осуществляют посредством фотометра, флуориметра, спектрофотометра, спектрофлуориметра или хемилюминометра.

12. Способ по пп.1-10, в котором при осуществлении фотометрии упомянутую среду с образцом термостатируют.

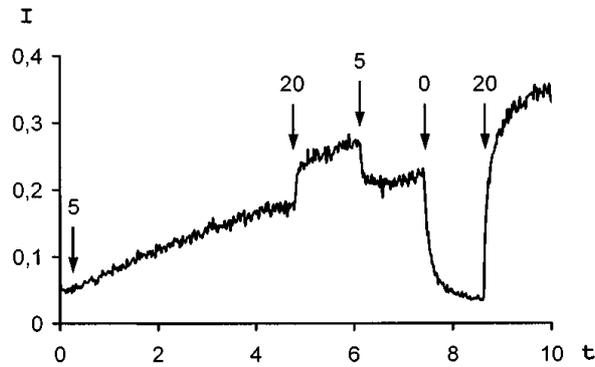
13. Способ по любому из пп.2-4, в котором осуществляют фотометрирование образца интактной и частично некротизированной ткани и, в случае и если разность скоростей убывания интенсивности све-

чения упомянутых образцов в анаэробные периоды превышает предварительно заданную величину, образец частично некротизированной ткани считают нежизнеспособным.

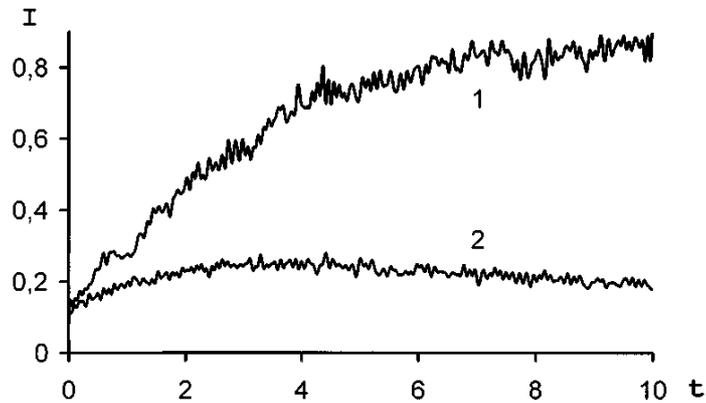
14. Способа по любому из пп.2-4 для определения степени некротизации тканей, в котором осуществляют фотометрирование образца интактной и частично некротизированной ткани, а разность скоростей убывания интенсивности свечения упомянутых образцов в анаэробные периоды используют в качестве показателя степени некротизации образца частично некротизированной ткани.



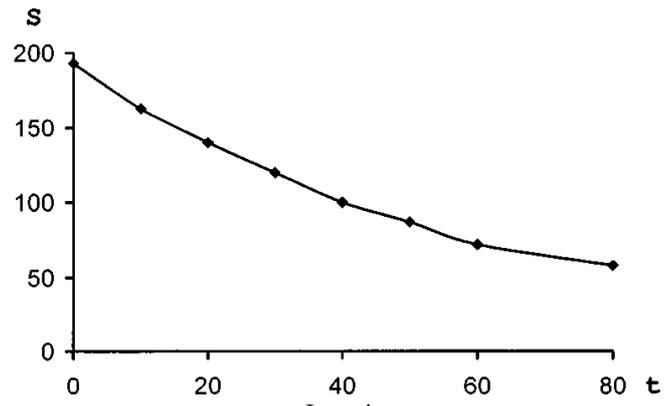
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

