



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 231 069** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) МПК⁷ **G 01 N 33/48, 21/76**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

(21), (22) Заявка: 2003109102/15, 31.03.2003
(24) Дата начала действия патента: 31.03.2003
(46) Дата публикации: 20.06.2004
(56) Ссылки: SU 1700478 A1, 23.12.1991. SU 1772759 A1, 30.10.1992. RU 2131125 C1, 27.05.1999. SU 1837235 A1, 30.08.1993. LINCHEVSKII G.L. Comparative characteristics of indices of the blood coagulation system in healthy children and children with intestinal infection following immunization with DPT vaccine. *Pediatr Akus Ginekol.* 1968;3;10-1. Ukrainian.
(98) Адрес для переписки:
660022, г.Красноярск, ул. П. Железняка, 1,
Красноярская государственная медицинская академия, патентный отдел

(72) Изобретатель: Котова Я.А. (RU),
Мартынова Г.П. (RU), Савченко А.А. (RU)
(73) Патентообладатель:
Красноярская государственная медицинская академия (RU)

(54) СПОСОБ ПРОГНОЗА ТЕЧЕНИЯ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ У ДЕТЕЙ 1-3 ЛЕТ

(57) Реферат:
Изобретение относится к медицине, в частности к диагностике, и предназначено для прогнозирования течения острых кишечных инфекций у детей 1-3 лет. Проводят исследование крови. Определяют метаболическую активность лимфоцитов биолюминесцентным методом. При снижении активности в лимфоцитах НАД(Ф)-зависимых

дегидрогеназ: Г6ФДГ до $0,47 \pm 0,10$ мкЕ и НАДФМДГ до $1,42 \pm 0,33$ мкЕ прогнозируют негладкое течение заболевания. При повышении уровня активности НАДФГДГ до $2,97 \pm 0,53$ мкЕ прогнозируют гладкое течение заболевания. Способ позволяет с достаточной точностью на ранних этапах заболевания прогнозировать течение острых кишечных инфекций. 2 табл.

RU 2 231 069 C1

RU 2 231 069 C1



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 231 069** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) Int. Cl.⁷ **G 01 N 33/48, 21/76**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 2003109102/15, 31.03.2003

(24) Effective date for property rights: 31.03.2003

(46) Date of publication: 20.06.2004

(98) Mail address:
660022, g. Krasnojarsk, ul. P. Zheleznjaka,
1, Krasnojarskaja gosudarstvennaja
meditsinskaja akademija, patentnyj otdel

(72) Inventor: Kotova Ja.A. (RU),
Martynova G.P. (RU), Savchenko A.A. (RU)

(73) Proprietor:
Krasnojarskaja gosudarstvennaja
meditsinskaja akademija (RU)

(54) **METHOD FOR PREDICTING THE FLOW OF INTESTINAL INFECTIONS IN 1-3-YEAR-AGED CHILDREN**

(57) **Abstract:**

FIELD: medicine, diagnostics.

SUBSTANCE: the present innovation deals with predicting the flow of acute intestinal infections in 1-3-year-aged children. Blood should be tested by detecting metabolic activity of lymphocytes due to bioluminescent method. In case of decreased activity in lymphocytes of NAD(P)-dependent dehydrogenases : G6PDH up to $0,47 \pm 0,10 \text{ mcU}$ and NADPMDH up to

$1,42 \pm 0,33 \text{ mcU}$ one should predict uneven flow of the disease mentioned. At increased level of NADPGDH up to $2,97 \pm 0,53 \text{ mcU}$ it is possible to predict even disease flow. The method enables to predict the flow of acute intestinal infections at earlier stages of the disease in question.

EFFECT: higher accuracy of prediction.
2 ex, 2 tbl

Изобретение относится к медицине, в частности к диагностике, и может быть использовано для прогнозирования течения патологического процесса.

Острые кишечные инфекции (ОКИ) представляют одну из актуальных проблем здравоохранения не только в нашей стране, но и во всем мире (1, 2). В России заболеваемость ОКИ у детей остается на высоком уровне, устойчиво занимая 2 место в структуре инфекционных заболеваний.

Однако, несмотря на актуальность данной проблемы, многие вопросы в изучении ОКИ требуют дальнейшей разработки. Существующие традиционные методы лабораторной диагностики ОКИ не позволяют на ранних этапах заболевания оценить ответную реакцию организма на патогенное действие инфекционно-токсических факторов, определить роль механизмов резистентности, критерии прогнозирования течения заболевания.

Не вызывает сомнений ключевая роль иммунной системы в развитии любых патологических процессов (3, 4, 5).

Реактивность иммунной системы в значительной степени определяет тяжесть любого инфекционного процесса. Различные звенья иммунной системы тесно взаимосвязаны между собой, в связи с чем, недостаточность одного из них, приводит к срыву всего механизма иммунореактивности (5, 6, 7).

Состояние иммунореактивности в настоящее время в основном оценивается иммунологическими методами, фиксирующими преимущественно морфологические особенности клеток иммунной системы, в меньшей степени, их функциональную активность. Между тем доказано, что уровень иммунореактивности определяется не только морфологическим составом иммунокомпетентных клеток и концентрацией иммуноглобулинов в сыворотке крови, но и уровнем метаболических процессов в иммунокомпетентных клетках, которые в значительной степени определяют функциональную активность иммунных клеток (8, 9, 10). Особенно высокой информативностью для исследования метаболизма активированных лимфоцитов обладают окислительно-восстановительные ферменты. Это связано с тем, что, являясь основными переносчиками электронов в клетке, они осуществляют ключевые реакции клеточного метаболизма и координируют сопряженные метаболические пути (11, 12, 13, 14). Инкубация лимфоцитов крови человека в течение 48-72 часов с митогенами приводит к параллельному увеличению активности всех ферментов гликолиза и цикла Кребса (10, 15). Так как вместе с уровнем активности гликолитических ферментов увеличивается синтез белка и РНК, авторы предполагают, что возросший уровень метаболических ферментов целиком определяется синтезом *de novo*. Уже не вызывает сомнений, что в основе функциональных проявлений лимфоцитов лежат их метаболические реакции. Предлагается в качестве структурной основы иммунной системы совместно с морфологическими данными использовать метаболические показатели иммунокомпетентных клеток (16, 17, 18).

В литературных источниках мы обнаружили исследования по изучению функциональной активности лимфоцитов крови биoluminesцентным методом (19). Между тем исследований, касающихся ОКИ нет, хотя можно предположить, что разнообразие клинических вариантов развития ОКИ у детей обусловлено различными дефектами в функционировании системы метаболизма лимфоцитов.

Целью изобретения является определение метаболической активности лимфоцитов крови на ранних этапах болезни в качестве прогноза течения ОКИ у детей 1-3 лет жизни. Поставленную цель осуществляют за счет того, что при снижении активности Г6ФДГ в лимфоцитах крови до $0,47 \pm 0,10$ мкЕ и НАДФМДГ до $1,42 \pm 0,33$ мкЕ прогнозируют негладкое течение заболевания, а при повышении уровня активности НАДФДГ до $2,97 \pm 0,53$ мкЕ прогнозируют гладкое течение ОКИ.

Способ осуществляют следующим образом. Забор крови проводят утром натощак по общепринятым правилам. Венозную кровь из локтевой вены забирали в пробирки с гепарином; затем выделение лимфоцитов производили центрифугированием в градиенте плотности фикоollверографина по методу A.Boyum (20). Для определения активности дегидрогеназ лимфоцитов крови суспензию выделенных лимфоцитов, содержащую клетки в концентрации 1,0 млн/мл, после однократного замораживания-размораживания дополнительно разрушали путем осмотического лизиса с добавлением дистиллированной воды (1:5 по объему) и 1,0-2,0 мМ дитиотреитола. Затем производили непосредственное определение активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ. Для этого в 150 мкл инкубационной смеси, содержащей соответствующий субстрат и кофактор, вносили 50 мкл суспензии разрушенных лимфоцитов. Конкретные значения концентраций субстратов и кофакторов, а также pH среды для определяемых ферментов представлены в табл.1. После инкубации исследуемых проб при 37°C в течение 30 минут (для ферментативных реакций с восстановлением НАД(Ф)⁺ или 5 минут (для реакций с окислением НАД(Ф)Н) к 200 мкл инкубационной смеси добавляли 50 мкл флавинмононуклеотида (ФМН) в концентрации $1,5 \times 10^{-5}$ М, 50 мкл 0,0005% миристинового альдегида и 10 мкл ферментативной системы НАД(Ф)Н:ФМНоксидоредуктаза-люцифераза (все реактивы биoluminesцентной системы разведены в 0,1 М K⁺, Na⁺ - фосфатном буфере с pH 7,0). После смешивания биoluminesцентных реактивов и инкубационной пробы с помощью биolumинометра "БЛМ-8803" (сконструирован в СКБ "Наука", г. Красноярск) производили измерение свечения.

Таблица 1
Концентрация субстратов, кофакторов и показатели pH среды для определения активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах биoluminesцентным методом

Фермент	Субстрат – мМ	Кофактор – мМ	pH буфера
Г6ФДГ	Г6Ф – 1,5	НАДФ – 0,025	9,8
НАДФМДГ	Малак – 7,5	НАДФ – 0,375	9,8
НАДФГДГ	Глутамат – 0,5	НАДФ – 1,65	9,8

Примечание: среды с pH 9,8 готовили на Трис-HCl буфере.

Ферментативная система НАД(Ф)Н:ФМНоксидоредуктаза-люцифераза

изготовлена из очищенных методами ионообменной хроматографии и гель-фильтрации люциферазы из *Photobacterium leiognathi* и оксидоредуктазы из *Vibrio fischeri* в Институте биофизики СО РАН г. Красноярск.

Учитывая, что в клетках имеется определенное количество субстратов для течения различных метаболических реакций, в том числе и катализируемых исследуемыми ферментами, нами определялись показатели, условно названные "субстратный фон ферментов". Определение производили в тех же условиях, что и для вышеперечисленных дегидрогеназ, но в инкубационную смесь вместо соответствующего субстрата вносили буфер.

Для построения графика зависимости интенсивности биолюминесценции от концентрации НАД(Ф)Н (калибровочный график) 200 мкл стандартного раствора НАД(Ф)Н в диапазоне 10^{-9} - 10^{-4} М вносили в кюветы биолюминометра, содержащие биолюминесцентные реактивы в концентрациях, указанных выше, после чего производилось измерение интенсивности биолюминесценции. В связи с широким диапазоном рН буферов, используемых для определения дегидрогеназной активности, а также рН-зависимостью биолюминесценции ферментативной системы (11), калибровочные графики строились для каждого рН буфера.

Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ рассчитывали по формуле:

$$\frac{\Delta[C] \times V \times 10^6}{T}$$

где $\Delta[C]$ - разница концентраций НАД(Ф)Н в пробах "фермент" и "фон фермента";
V - объем пробы в миллилитрах;
T - время инкубации.

Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ выражали в ферментативных единицах на 10^4 клеток, где 1 Е=1 мкмоль/мин (21).

При исследовании уровней активности метаболических ферментов в лимфоцитах крови у детей 1-3 лет с ОКИ с помощью биолюминесцентного метода обнаружены специфические особенности, которые характерны для гладкого и негладкого течения инфекционного процесса. Так, у детей с негладким течением ОКИ выявляется выраженное снижение активности Г6ФДГ в лимфоцитах крови статистически достоверное как относительно контрольного диапазона, так и параметров активности при гладком течении ОКИ ($2,21 \pm 0,40$ мкЕ; $2,38 \pm 0,43$ мкЕ; $0,47 \pm 0,10$, $P < 0,01$, соответственно, в контроле и у больных с гладким и негладким характером течения ОКИ). Также, у данной исследуемой группы детей выявляется статистически достоверное снижение внутриклеточной активности НАДФМДГ относительно контрольного диапазона и обнаруженного у больных с гладким течением ОКИ ($8,63 \pm 1,64$ мкЕ; $14,17 \pm 3,25$ мкЕ; $1,42 \pm 0,33$ мкЕ, $P < 0,01$, соответственно, в контроле и у больных с гладким и негладким характером течения ОКИ). Только относительно диапазона, выявленного у детей с гладким течением ОКИ, обнаружено достоверное снижение

уровней активности НАДФГДГ у больных с негладким течением инфекционного процесса ($0,52 \pm 0,17$ мкЕ; $2,97 \pm 0,51$ мкЕ, $P < 0,01$, соответственно, у больных с негладким и гладким характером течения ОКИ) (табл.2). Г6ФДГ и НАДФМДГ определяют интенсивность реакций, связанных с анаболическими процессами. Продукты Г6ФДГ используются в реакциях макромолекулярного синтеза. НАДФМДГ катализирует ключевую реакцию липидного анаболизма. Снижение уровня активности Г6ФДГ и НАДФМДГ позволяет предположить пониженный уровень достаточно широкого ряда синтетических процессов, а снижение активности НАДФГДГ - ингибирование переноса субстратов для реакций лимонного цикла.

Таблица 2
Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов крови у детей в возрасте 1 - 3 лет в зависимости от характера течения острой кишечной инфекции ($X \pm m$)

Показатели	Здоровые N=22 1	Характер течения	
		1 гладкое N=40 2	Негладкое N=21 3
Г6ФДГ, (мкЕ)	$2,21 \pm 0,40$	$2,38 \pm 0,43$	$0,47 \pm 0,10$ $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,01$
НАДФМДГ, (мкЕ)	$8,63 \pm 1,64$	$14,17 \pm 3,25$	$1,42 \pm 0,33$ $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,01$
НАДФГДГ, (мкЕ)	$1,57 \pm 0,63$	$2,97 \pm 0,51$ $P_1 < 0,05$	$0,52 \pm 0,17$ $P_1 < 0,01$

Примечание: P_1 - статистически достоверные различия с параметрами здоровых детей; P_2 - статистически достоверные различия с параметрами детей с гладким течением ОКИ.

Пример 1.

Больная Диана Х., 1 г. 4 м, поступила в стационар с диагнозом: кишечная инфекция, гастроэнтероколит, тяжелый, токсикоз с экзикозом II степени. Из анамнеза заболевания известно, что девочка заболела остро с появления многократной рвоты, частого жидкого стула, повышения температуры до $39,0^\circ$. Состояние при поступлении тяжелое. Обследование крови, проведенное в стационаре по предлагаемому способу, показало наличие снижения активности Г6ФДГ до 0,42 мкЕ и НАДФМДГ до 1,39 мкЕ, в связи с чем было заподозрено негладкое течение заболевания. Больной проводилось комплексное лечение, однако, улучшения состояния не наблюдалось. Сохранялась гипертермия, симптомы интоксикации. В развернутом анализе крови были обнаружены воспалительные изменения. При дальнейшем обследовании выявилось наличие у ребенка инфекции мочевыводящих путей. Бак. посев кала дал рост *Salmonella enteritidis*.

На основании клинических данных и в результате проведенного комплексного обследования был выставлен диагноз: сальмонеллез (*Salm. enteritidis*), гастроэнтероколит, тяжелый, токсикоз с экзикозом II степени, острое негладкое течение. Инфекция мочевыводящих путей.

Особенностью метаболизма лимфоцитов крови у детей с гладким течением ОКИ является наличие тенденции к увеличению уровня активности НАДФГДГ ($1,57 \pm 0,63$ мкЕ; $2,97 \pm 0,53$ мкЕ, $P < 0,05$; $0,52 \pm 0,17$ мкЕ, $P < 0,01$, соответственно, в контроле и у больных с гладким и негладким течением ОКИ) (табл.2). Повышение активности вспомогательных дегидрогеназных реакций - НАДФГДГ - стимулирует субстратный поток по лимонному циклу за счет повышения

переноса субстратов.

Пример 2.

Больной Дима Д., 2 г. 5 мес, поступил в стационар с диагнозом: кишечная инфекция, энтероколит средней тяжести. Из анамнеза заболевания известно, что ребенок заболел остро с появления болей в животе, жидкого стула до 8 раз в день с патологическими примесями, повышения температуры до 38,5°. Состояние при поступлении средней тяжести. Обследование крови, проведенное в стационаре по предлагаемому способу, показало наличие увеличения активности НАДФГДГ до 2,93 мкЕ, в связи с чем было предположено гладкое течение заболевания. Больному проводилось комплексное обследование и лечение. В развернутом анализе крови были обнаружены воспалительные изменения. Бак. посев кала дал рост *Shigella Flexneri*. В результате проведенного лечения быстро наступила положительная динамика - симптомы интоксикации купированы к 5 дню, стул нормализовался к концу недели.

На основании клинических данных и в результате проведенного комплексного обследования был выставлен диагноз: Шигеллез (*Sh. Flexneri*), типичный, средней тяжести, острое гладкое течение.

Таким образом, применение биолюминесцентного анализа для исследования функциональной активности лимфоцитов крови у больных 1-3 лет в зависимости от течения ОКИ показывает, что у детей с негладким течением ОКИ выявляется пониженный уровень широкого ряда синтетических процессов, проявляющийся в снижении активности Г6ФДГ и НАДФМДГ. У больных детей с гладким течением ОКИ выявляется стимуляция субстратного потока по циклу Кребса, проявляющаяся повышением активности НАДФГДГ.

Использование биолюминесцентного анализа для определения показателей активности ферментов лимфоцитов крови в зависимости от течения инфекционного процесса по сравнению с традиционными лабораторными методами позволяет с достаточной точностью на ранних этапах заболевания выявить больных с более глубокими изменениями метаболического статуса лимфоцитов, что может быть использовано для определения прогноза течения кишечной инфекции. В свою очередь своевременная оценка течения ОКИ по состоянию активности метаболических ферментов лимфоцитов крови на ранних этапах заболевания позволит проводить адекватную терапию с включением в комплекс лечебных мероприятий средств иммунокоррекции.

Источники информации

1. Учайкин В.Ф. Руководство по инфекционным болезням. - М., 1999. - 809 с.
2. Краснов В.В. Инфекционные болезни в практике педиатра. - Нижний Новгород, 1997. - с.97.

3. Педиатрия. - 1992. - №1. - с.93-100.

4. Йегер Л. Клиническая иммунология и аллергология. / Пер. с нем. - М.: Медицина. 1990. - Т.1. - 528 с.

5. Петров Р.В., Орадовская И.В. Эпидемиология иммунодефицитов. - М.: Медицина. 1988. - 116 с.

6. Педиатрия. - 1988. - №10. - с.43-47.

7. Хахалин Л.Н., Гомес Л.А., Порховатый С.Я. и др. Клиническая диагностика иммунологической недостаточности у детей. //Методические рекомендации/Под ред. Р.В.Петрова. - М., 1986. - 39 с.

8. Куртасова Л.М., Савченко А.А., Манчук В.Т. Метаболические аспекты иммунных нарушений у детей с заболеваниями органов дыхания. - Новосибирск: СО РАМН, 2001. - 107 с.

9. Бюлл. эксперим. биол. и мед. - 1995. - Т.119, №2. - С.181-183.

10. De Azevedo R.B., Rosa L.F., Lacava Z.G., Curi R. Gonadectomy impairs lymphocyte proliferation and macrophage function in male and female rats. Correlation with key enzyme activities of glucose and glutamine metabolism//Cell Biochem.Funct. - 1997. - Vol.15, №4. - P.293-298.

11. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия. - М.: Медицина, 1998. - 704 с.

12. Кнорре Д.Г., Мызина С.Д. Биологическая химия. - М.: Высш. школа, 1998. - 479 с.

13. Бюлл. эксперим. биол. и мед. - 2000. - Т.129, №1. - С.53-55.

14. Бюлл. эксперим. биол. и мед. - 2001. - Т.131, №4. - С.392-395.

15. Moriwaki Y., Yamamoto I., Higashino K. Enzymes involved in purine metabolism - a review of histochemical localization and functional implications//Histol. Histopathol. - 1999. - Vol.14, №4. - P.1321-1340.

16. Захарова Л.Б., Манчук В.Т., Нагирная Л.А. Метаболизм иммунокомпетентных клеток жителей Севера в онтогенезе. - Новосибирск, 1999. - 144 с.

17. Савченко А.А. Нарушение метаболического статуса лимфоцитов и иммуноэндокринного взаимодействия в патогенезе вторичных иммунодефицитов и гиперактивного состояния иммунной системы: Автореф. дис...докт. мед. наук. - Томск, 1996. - 34 с.

18. Бюлл. эксперим. биол. и мед. - 1995. - Т.119, №2. - С.181-183.

19. Лаб. дело. - 1991. - №11. - С.22-25.

20. Boyum A. // Scand. J. Clin. Lab. Invest. - 1968. - Vol.21 (Suppl.97). - P77-80.

21. Светящиеся бактерии//И.И.Гительзон, Э.К.Родичева, С.Е.Медведева и др. - Новосибирск: Наука, 1984. - 278 с.

Формула изобретения:

Способ прогноза течения острых кишечных инфекций у детей 1-3 лет, включающий исследование крови, отличающийся тем, что определяют метаболическую активность лимфоцитов биолюминесцентным методом, и при снижении активности в лимфоцитах НАДФ(Ф)-зависимых дегидрогеназ: Г6ФДГ до $0,47 \pm 0,10$ мкЕ и НАДФМДГ до $1,42 \pm 0,33$ мкЕ прогнозируют негладкое течение заболевания, а при повышении уровня активности НАДФГДГ до $2,97 \pm 0,53$ мкЕ прогнозируют гладкое течение заболевания.