

# ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(12)

РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ



НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР  
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ  
СОБСТВЕННОСТИ

(19) ВУ (11) 9451

(13) С1

(46) 2007.06.30

(51) МПК (2006)

A 61B 5/05

G 01N 33/487

G 01N 27/06

## (54) СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ РЕВМАТИЧЕСКОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ

(21) Номер заявки: а 20040044

(22) 2004.01.22

(43) 2005.09.30

(71) Заявитель: Государственное научное учреждение "Институт механики металлополимерных систем имени В.А.Белого Национальной академии наук Беларуси" (ВУ)

(72) Авторы: Пинчук Леонид Семенович; Чернякова Юлия Михайловна; Цветкова Елена Александровна; Николаев Владимир Иванович; Кадолич Жанна Владимировна; Зотов Сергей Валентинович; Кравцов Александр Геннадьевич (ВУ)

(73) Патентообладатель: Государственное научное учреждение "Институт механики металлополимерных систем имени В.А.Белого Национальной академии наук Беларуси" (ВУ)

(56) RU 2173462 С1, 2001.

SU 1520448 А1, 1989.

UA 44173 А, 2002.

(57)

Способ диагностики ревматического заболевания, отличающийся тем, что пробу синовиальной жидкости пациента подвергают электротно-термическому анализу, регистрируют спектр термостимулированных токов, сравнивают его со спектром термостимулированных токов синовиальной жидкости здорового человека, который имеет низкотемпературный пик в области от 35 °С до 50 °С, среднетемпературный пик в области от 80 °С до 100 °С и высокотемпературный пик в области от 110 °С до 120 °С, и при изменении полярности низкотемпературного и высокой температуры не менее, чем на 10 °С - ревматоидный артрит, при исчезновении низкотемпературного пика и появлении слабоинтенсивных пиков при температуре 75 °С, 100 °С и 120 °С - хронический синовит в стадии обострения, а при исчезновении низкотемпературного пика и появлении пиков в области 60 °С, 70 °С, 90 °С и 120 °С - острый синовит.

Изобретение относится к области диагностического исследования синовиальной жидкости (СЖ) путем регистрации биоэлектрических сигналов, возникающих при термообработке ее проб.

СЖ представляет собой сложную по химическому составу и пространственной структуре биологическую среду. Ее основными компонентами являются белково-полисахаридные комплексы, в состав которых входит специфический протеогликан - гиалуриновая кислота (ГУК). Структурные образования СЖ представляют собой многоуровневую систему, включающую гидратные оболочки вокруг полярных составляющих синовии, ассоциаты белков и полисахаридов, жидкокристаллические структуры на основе соединений холе-

# ВУ 9451 С1 2007.06.30

стерина. Пространственная структура СЖ оказывает большое влияние на ее функции (метаболическую, трибологическую, трофическую и барьерную) и изменяется при заболеваниях суставов и организма в целом. Существующие в медицине методы анализа СЖ позволяют оценить преимущественно химический состав синовии, но дают недостаточно информации о ее пространственной структуре.

Известен способ оценки метаболических костных заболеваний [1], согласно которому СЖ или кровь подвергают иммунологическому анализу. Определяют концентрацию фактора, ингибирующего остеокластогенез (ОСIF), по которой судят о наличии и типе заболевания.

Недостатком способа является большая продолжительность и высокая стоимость исследования.

Способ определения белка в биологической жидкости [2] заключается в высушивании исследуемой жидкости на стекле при  $T = 18-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Определяют ширину и диаметр краевой зоны высушенной капли, в которой преимущественно концентрируется белок. По этим параметрам вычисляют содержание белка.

Способ, к сожалению, не дает информации о пространственной структуре компонентов биологической жидкости.

В травматологии и ортопедии применяют способ [3] прогнозирования развития реактивного артрита после операционного лечения закрытой травмы коленного сустава. Во время операции спектрофотометрически регистрируют концентрацию среднемолекулярных пептидов и микроскопически - содержание некротических субстанций, по которым прогнозируют осложненное течение заболевания.

Способ связан с применением дорогостоящей аппаратуры, требует значительных затрат времени, а его реализация создает технические сложности при проведении операции.

Способ оценки внутрисуставного воспаления [4] состоит в исследовании структурно-оптических свойств СЖ методом поляризационной фотометрии. Каплю СЖ помещают в 0,9 % раствор NaCl и определяют коэффициент поглощения, по величине которого делают заключение о фазе воспаления сустава.

Недостаток способа состоит в том, что он не позволяет установить причину изменения структурно-оптических свойств СЖ и требует применения дополнительных биохимических методов анализа.

Прототипом изобретения является способ тестирования на наличие ревматического заболевания [5]. Он состоит в морфологическом изучении структуры высушенных проб СЖ и плазмы крови в поляризованном свете. Сравнивают образующиеся при высушивании текстуры в виде сферолитных и дендритных образований. По преобладанию тех или иных форм диагностируют остеоартроз, ревматоидный или реактивный артрит.

Недостаток прототипа:

метод не дает представления о физико-химической природе структурных образований СЖ;

он относится к качественным методам анализа и основан на субъективной оценке наблюдаемых текстур;

вид анализируемых текстур зависит от условий высушивания и хранения препаратов, которые не определены в патенте;

для проведения сравнительного анализа требуется забор у пациента не только СЖ, но и крови.

Задачи, на решение которых направлено настоящее изобретение:

1) определить показатели, позволяющие осуществлять диагностику ревматических заболеваний по изменению структуры компонентов СЖ, и их взаимодействия;

2) обеспечить возможность количественной оценки структурных изменений СЖ;

3) исключить взятие крови у пациента;

4) обеспечить возможность анализа проб СЖ, подвергнутых консервации и хранившихся длительное время;

5) применить для анализа СЖ чувствительный метод электретно-термического анализа, используемый в физике диэлектриков для регистрации физико-химических взаимодействий, происходящих на молекулярном уровне.

Поставленные задачи решаются тем, что известный способ диагностики ревматических заболеваний по результатам анализа СЖ, заключающийся в поляризационно-оптическом исследовании высушенных препаратов плазмы крови и синовии и сравнении образующихся при высушивании текстур, дополняют новыми операциями. Пробу СЖ пациента подвергают электретно-термическому анализу и регистрируют спектр термостимулированных токов (ТСТ). Затем сравнивают его со спектром ТСТ синовиальной жидкости здорового человека, который имеет низкотемпературный пик в области от 30 °С до 50 °С, среднетемпературный пик в области от 80 °С до 100 °С и высокотемпературный пик в области от 110 °С до 120 °С. При изменении полярности низкотемпературного и среднетемпературного пиков диагностируют болезнь Бехтерева. При исчезновении низкотемпературного пика, росте интенсивности и смещении высокотемпературного пика в область высокой температуры не менее, чем на 10 °С - ревматоидный артрит. При исчезновении низкотемпературного пика и появлении слабоинтенсивных пиков при температурах 75 °С, 100 °С и 120 °С - хронический синовит в стадии обострения. При исчезновении низкотемпературного пика и появлении пиков в области 60 °С, 70 °С, 90 °С и 120 °С - острый синовит.

Сущность изобретения состоит в том, что структурированное состояние СЖ обуславливает электретный эффект при нагревании. При термостимулированном разрушении водородных связей, ответственных за образование гидратных оболочек вокруг полярных компонентов СЖ, разрушении молекулярных связей в полисахаридных комплексах и в белковых ассоциатах, разрыве связей в макромолекулах белка, а также при перестройке жидкокристаллических структур СЖ происходит высвобождение носителей заряда. Их перемещение обуславливает термостимулированный ток. Каждый тип связей разрушается при определенной температуре, а интенсивность пиков ТСТ соответствует количеству разрушенных связей и высвобождающихся при разрушении свободных носителей зарядов. Это позволяет диагностировать ревматические заболевания путем сравнения спектров ТСТ синовиальных жидкостей здорового человека и пациента, структура СЖ которого претерпела патологические изменения.

Приведем примеры реализации способа.

Аналізу подвергали СЖ, взятую из коленного сустава пациентов с различной суставной патологией: болезнь Бехтерева, ревматоидный артрит, хронический синовит в стадии обострения, острый синовит. Для сравнения исследовали СЖ, взятую из условно здоровых коленных суставов при проведении диагностической артроскопии.

Пробу СЖ (0,1-0,2 мл) помещали на обезжиренный латунный электрод, накрывали обработанной этиловым спиртом тефлоновой прокладкой, на которую накладывали второй электрод. Регистрировали ТСТ, который возникает в цепи, замыкающей электроды, при нагревании образца с постоянной скоростью 5 °С/мин. В состав измерительной установки входила деполяризационная ячейка с программатором температуры и измерителем токов. Зарядовые характеристики проб СЖ определяли по ГОСТ 25209-82 "Пластмассы и пленки полимерные. Методы определения поверхностных зарядов электретов". Приведенные ниже результаты являются средними не менее чем 7 измерений.

Дополнительно выполняли анализ состава белковых фракций СЖ методом фотоэлектродиметрии, применяемым в медицинской лабораторной диагностике.

На рисунках приведены спектры ТСТ исследованных проб СЖ: фиг. 1 - здоровая СЖ, фиг. 2 - СЖ при болезни Бехтерева, фиг. 3 - при ревматоидном артрите, фиг. 4 - при хроническом синовите в стадии обострения, фиг. 5 - при остром синовите.

Типичный спектр ТСТ свежей здоровой СЖ (фиг. 1, кривая 1) имеет три пика: низко-, средне- и высокотемпературный.

## ВУ 9451 С1 2007.06.30

Низкотемпературный пик релаксации отрицательного заряда соответствует 35-50 °С. Он отвечает термически стимулированному разрушению координационных структур, которые состоят из белковых макромолекул, окруженных гидратными оболочками. Последние образуются в результате присоединения молекул воды посредством водородных связей к полярным фрагментам макромолекул. Энергия активации процесса релаксации заряда, соответствующего этому пику, составляет  $W_1 = 0,25-0,45$  эВ, что подтверждает возможность связывания молекул воды в структуры со сложной пространственной конфигурацией. Этому же температурному диапазону соответствует высвобождение зарядов, происходящее при тепловой перестройке жидкокристаллических структур СЖ на основе производных холестерина.

Среднетемпературный пик ( $T = 80-100$  °С) релаксации положительного заряда соответствует разрушению белково-полисахаридных комплексных соединений, надмолекулярных белковых образований, а также необратимым изменениям третичной и частично вторичной структуры белка, не сопровождающимся разрывом полипептидной цепи. Энергия активации этих процессов  $W_2 = 0,5-0,7$  эВ.

Самый интенсивный пик соответствует температурам 110-120 °С. Он частично перекрывается со среднетемпературным пиком, образуя двойной пик, и соответствует фазовому переходу в белковой составляющей СЖ, приводящему к образованию твердой пленки. Термоокислительная деструкция белковых макромолекул сопровождается высвобождением зарядов, обуславливающих появление этого пика.

Сравнение спектров ТСТ свежей и криоконсервированной СЖ подтверждает идентичность расположения всех трех пиков на шкале температур, однако после криоконсервации пики менее интенсивны.

Спектр СЖ при болезни Бехтерева (фиг. 2) аналогичен спектру здоровой СЖ за исключением того, что среднетемпературный пик соответствует отрицательному току. Это вызвано, во-первых, тем, что содержание белка при этом виде патологии суставов значительно превышает норму, и, во-вторых, тем, что в СЖ присутствуют патологические белковые фракции (С-реактивный белок, фибриноген, серомукоид), имеющие измененную конформацию. Это подтверждено результатами биохимического анализа СЖ (таблица).

| Образцы СЖ                                 | Прозрачность | Вязкость          | Муциновый сгусток | Содержание ГУК | Содержание белка, г/л | Примечания   |
|--|--------------|-------------------|-------------------|----------------|-----------------------|--|
| 1. Здоровая                                | Прозр.       | Вязкая            | Плотный           | Норма          | 10-30                 |  |
| 2. Болезнь Бехтерева                       | Прозр.       | Снижена           | Рыхлый            | Снижено        | 5                     | Наличие патологических фракций белка                               |
| 3. Ревматоидный артрит                     | Мутн.        | Незначит. снижена | Рыхлый            | Снижено        | 53                    | Наличие патологических фракций белка, в т.ч. ревматоидного фактора |
| 4. Хронический синовит в стадии обострения | Прозр.       | Снижена           | Рыхлый            | Снижено        | 32                    | -  |
| 5. Острый синовит                          | Прозр.       | Резко снижена     | Рыхлый            | Резко снижено  | 36                    | Деструкция макромолекул  |

Спектр ТСТ синовию при ревматоидном артрите (фиг. 3) отличается от спектра здоровой СЖ отсутствием низкотемпературного пика и смещением высокотемпературного в область высоких температур (~ 140 °С). Это свидетельствует о разрушении гидратных оболочек вокруг полярных структур СЖ и перестройке жидкокристаллической мезофазы.

# ВУ 9451 С1 2007.06.30

Аномально высокая интенсивность высокотемпературного пика вызвана большим содержанием в СЖ белковых фракций, в том числе патологических (таблица). Последние образуют с ГУК более крупные и прочные, чем в здоровой СЖ, надмолекулярные структуры. Для их теплового разрушения требуется повышенная температура, при этом высвобождается большее количество носителей зарядов.

Спектр ТСТ синовии при хроническом синовите в стадии обострения (фиг. 4) характеризуется отсутствием низкотемпературного и появлением слабоинтенсивных средне- и высокотемпературных пиков (~ 75, 100 и 120 °С). Известно (Герасимов А.М., Фурцева Л.Н. Биохимическая диагностика в травматологии и ортопедии. - М.: Медицина, 1986. - 234 с), что хроническое воспаление сустава сопровождается снижением молекулярной массы белковых макромолекул СЖ. Об этом свидетельствует снижение вязкости СЖ и образование в ней рыхлого муцинового сгустка (таблица). В зависимости от молекулярной массы молекулы белка образуют несколько типов надмолекулярных структур, каждому из которых соответствует пик на спектре ТСТ. Отсутствие низкотемпературного пика свидетельствует о разрушении при хроническом синовите гидратных оболочек и о разупорядочении жидкокристаллических структур.

Спектр СЖ при остром синовите (фиг. 5) содержит четыре пика положительного тока в области средних и высоких температур (~ 60, 70, 90 и 120 °С). Острый синовит приводит к резкому снижению молекулярной массы молекул белка и ГУК в СЖ. Это обуславливает резкое снижение вязкости СЖ и образование в ней наиболее рыхлого муцинового сгустка (таблица). Пики на спектре ТСТ соответствуют разрушению четырех типов надмолекулярных белково-полисахаридных образований, состоящих из различных по длине макромолекул.

Таким образом, предложенный способ позволяет диагностировать ревматические заболевания суставов. Способ дает информацию о наличии в СЖ связанной воды, относительной длине белковых макромолекул, а также об энергонасыщенности связей в белково-полисахаридных комплексах, которые соответствуют различным патологическим состояниям суставов.

Согласно способу-прототипу пробы СЖ высушивали на предметных стеклах и изучали морфологию образовавшихся текстур в поляризованном свете оптического микроскопа. Обнаружено преобладание кристаллических образований в виде дендритов в здоровой СЖ и при болезни Бехтерева, сферолитов - при ревматоидном артрите и остром синовите. В равных количествах эти образования обнаружены в пробах СЖ при хроническом синовите. Таким образом, способ-прототип позволяет диагностировать только ревматоидный артрит, реактивный артрит и остеоартроз. Он не дает никакой информации о пространственной структуре СЖ, длине белковых макромолекул, свойствах надмолекулярных структур и природе связей в них. Объективную информацию об этих показателях дает предложенный способ.

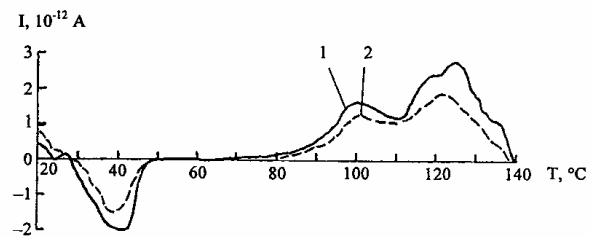
Итак, заявляемый способ превосходит прототип по информативности данных о течении ревматических заболеваний, позволяет анализировать не только свежую, но и криоконсервированную СЖ, использовать минимальные по объему пробы.

Предложенный способ может найти применение в ортопедии, ревматологии и травматологии как простое и информативное средство диагностики ревматических заболеваний.

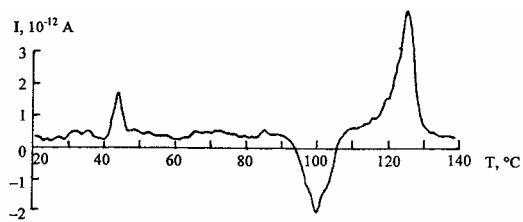
## Источники информации:

1. Патентная заявка JP № 98/03421, G 01 N 33/53, C 12 P, 21/08, 2001.
2. А.с. СССР № 1681182, G 01 N 1/28, 1991.
3. Патент РФ № 2194989, G 01 N 33/52, 2002.
4. Патент РФ № 2159434, G 01 N 33/52, 33/483, 33/48, 2000.
5. Патент РФ № 2173462, G 01 N 33/48, 33/68, 2001 (прототип).

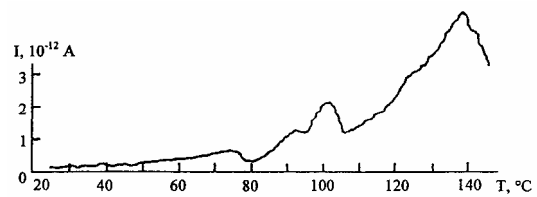
# BY 9451 C1 2007.06.30



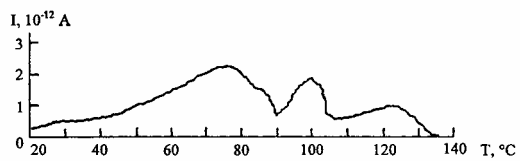
Фиг. 1



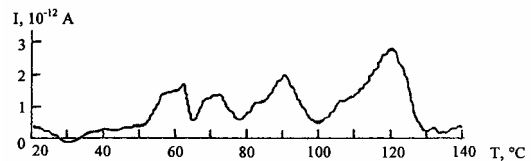
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5