



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **119452** (13) **U**

(51) МПК (2017.01)

G09B 23/28 (2006.01)

G01N 21/00

G01N 33/48 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2017 03452**

(22) Дата подання заявки: **10.04.2017**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **25.09.2017**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **25.09.2017, Бюл.№ 18**

(72) Винахідник(и):

**Марущак Марія Іванівна (UA),
Криницька Інна Яківна (UA),
Ліснянська Наталія Василівна (UA),
Мялюк Оксана Петрівна (UA),
Бегош Ніна Богданівна (UA)**

(73) Власник(и):

**ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ
ЗАКЛАД "ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ
ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО МОЗ
УКРАЇНИ",**

**вул. Майдан Волі, 1, м. Тернопіль, 46001
(UA)**

(74) Представник:

Павлишин Андрій Володимирович

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ МІТОХОНДРІАЛЬНОЇ ДИСФУНКЦІЇ ПРИ МОДЕЛЮВАННІ ПАТОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

(57) Реферат:

Спосіб визначення мітохондріальної дисфункції клітин лейкоцитарної суспензії при патологічному процесі включає визначення характеру цитолізу лейкоцитів, додаткового визначення відсотку активних форм кисню, що продукують лейкоцити, і відсоток клітин лейкоцитарної суспензії зі зниженим мітохондріальним трансмембранним потенціалом за даними цитофлюорометричного аналізу. Діагностичний висновок роблять за інтегральним індексом мітохондріальної дисфункції (I_{md}).

UA 119452 U

Корисна модель належить до медицини і цитології, зокрема клінічної лабораторної діагностики, і може бути використана в експериментальній патології і широкій медичній практиці при проведенні діагностичних досліджень. Найближчим аналогом до корисної моделі є визначення мітохондріальної дисфункції клітин крові, при моделюванні патологічного процесу, який включає відтворення умов взаємодії клітин нативної крові з цитолітичним чинником [1]. За відомим способом, мітохондріальну дисфункцію ізольованих клітин вивчають за рівнем їх апоптичної загибелі під впливом чинників різного характеру або ж за рівнем деструкції мітохондрій клітин при електронно-мікроскопічному дослідженні.

Недоліком відомого способу є недостатній рівень інформативності і точності діагностичного дослідження, що впливає із участі в діагностичній реакції одночасно значної кількості клітин та із обмеженням його даними лише про рівень мембранодеструктивної дії, перш за все, за умови патологічного процесу, тоді як внутрішньоклітинні механізми залишаються поза увагою.

В основу корисної моделі поставлено задачу вдосконалити відомий спосіб, в якому шляхом введення додаткових технологічних прийомів дослідження функції мітохондрій, спрямованих на виявлення прихованих механізмів пошкодження клітинних мембран, особливо в аспекті його формування і розвитку в ході патологічного процесу, досягають підвищення інформативності і точності діагностичного дослідження.

При вирішенні технічної задачі було взято до уваги те, що ранніми ознаками дисфункції мітохондрій є пошкодження клітинних мембран, яке відбувається внаслідок надмірної генерації активних форм кисню у мітохондріях, які модифікують макромолекули ферментних білків і нуклеїнові кислоти, а також фосфоліпідні мембрани цих та інших органел. Пошкоджені мітохондрії зазвичай виступають постійним джерелом агресивних продуктів порушеного метаболізму і власних компонентів, здатних негативно впливати на внутрішньоклітинні процеси, ініціюючи дезорганізацію біоелектричної активності мембран, зумовлюючи апоптичну загибель клітин [2].

Виходячи з наведених міркувань, у відомому способі оцінки мітохондріальної дисфункції при моделюванні патологічного процесу, що включає визначення рівня клітин з явищами апоптозу маркера пошкодження зовнішньої мембрани клітин, відповідно до корисної моделі, додатково визначають відсоток активних форм кисню, що продукують лейкоцити, і відсоток клітин лейкоцитарної суспензії зі зниженим мітохондріальним трансмембранним потенціалом за даними цитофлуориметричного аналізу, причому діагностичний висновок роблять за інтегральним індексом мітохондріальної дисфункції (I_{md}) за допомогою формули:

$$I_{md}=1000 \cdot r \cdot \mu \cdot \alpha \quad (1)$$

де

r - показник вмісту активних форм кисню, %;

μ - число лейкоцитів із зниженим мітохондріальним трансмембранним потенціалом, %;

α - показник рівня апоптозу, %.

Спосіб здійснюють наступним чином. У лабораторної тварини забирають кров на аналіз: по 0,70 мл до і після відтворення патологічного процесу. Далі за методикою проточної цитофлуориметрії визначають послідовно показники вмісту активних форм кисню (%), числа лейкоцитів із зниженим мітохондріальним трансмембранним потенціалом (%) та відсотку клітин лейкоцитарної суспензії з ознаками апоптозу (%). Отримані дані заносять у робочу таблицю, після чого, користуючись формулою 1, визначають інтегральний індекс мітохондріальної дисфункції, за рівнем якого оцінюють пошкодження мітохондріальних мембран лейкоцитів при вибраному патологічному процесі.

Приклад 1. На статевозрілому щурі-самці масою 210 г моделюють поєднану травму грудної клітки та обох стегон. Тварину анестезують внутрішньо-очеревинним введенням тіопенталу натрію в дозі 40 мг/кг маси тварини. За допомогою троакара моделюють правобічний закритий пневмоторакс із переломом ребра та поєднують з переломом лівої і правої стегнових кісток. Післяопераційну рану пошарово, наглухо зашивають. Скелетну травму моделюють шляхом нанесення однократного дозованого удару спеціально розробленим пристроєм по кожному стегну, який викликає закритий перелом. Енергія удару становить 0,375 Дж, що відповідає травмі середнього ступеня тяжкості. Поєднану травму моделюють шляхом послідовного нанесення обох ушкоджень. На 7-у добу після травми тварину виводять з експерименту під тіопенталовим наркозом. Методом проточної цитофлуориметрії визначають рівень активних форм кисню лейкоцитів, трансмембранний мітохондріальний потенціал та показник рівня апоптозу. Рівень активних форм кисню лейкоцитів 10 складав 55,7 (%), відсоток лейкоцитів із зниженим мітохондріальним трансмембранним потенціалом -3,0 (%), показник рівня апоптозу -

7,4 (%). Розрахували інтегральний індекс мітохондріальної дисфункції за допомогою формули 1, а саме:

$$I_{md}=1000/(55,7 \cdot 3,0 \cdot 7,4) = 0,8$$

- 5 Приклад 2. Запропонованим способом оцінювали рівень мітохондріальної дисфункції лейкоцитів при патологічному процесі у 6 білих статевозрілих нелінійних щурів масою 200-220 г. Рівень мітохондріальної дисфункції у вигляді зазначених діагностичних показників наведено у таблиці.

Таблиця

№ п/п	Контрольна група				Дослідна група			
	r, %	μ, %	α, %	lmd	r, %	μ, %	α, %	lmd
1	17,4	1,2	5,1	9,4	55,7	3,0	7,4	0,8
2	18,1	1,4	5,9	6,7	60,4	4,1	8,5	0,5
3	16,5	0,9	4,7	14,3	54,3	3,4	7,1	0,8
4	17,6	1,6	5,4	6,6	56,7	3,2	7,8	0,7
5	17,5	1,2	5,6	8,5	52,1	3,8	7,9	0,6
6	19,2	1,9	6,2	4,4	60,3	3,9	8,1	0,5
M±m	17,7±0,36	1,4±0,1	5,5±0,2	8,3±1,4	56,6±1,3	3,6±0,2	7,8±0,2	0,7±0,6

- 10 В результаті встановлено, що індекс мітохондріальної дисфункції при поєднаній травмі грудної клітки та обох стегон у щурів достовірно перевищував ($p<0,001$) дані контрольної групи. Наведені дані засвідчують високу точність дослідження та інформативність показників.

- Отже, запропонований спосіб забезпечує вищий, ніж за відомим способом-найближчим аналогом, рівень точності та інформативності, і може бути застосований в клініко-лабораторній практиці та експериментальних дослідженнях.

Джерела інформації, які слід взяти до уваги:

1. Патент на корисну модель № 104516 Україна, МПК А61К 31/00 А61Р 25/28 (2006.01). Спосіб корекції мітохондріальної дисфункції при церебральній ішемії в експерименті / Бєленічев І.Ф., Бухтіярова Н.В., Павлов СВ., Бєленічева О.І. (Україна); Заявл. 30.06.2015; Опубл. 10.02.2016, бюл. №3.

2. Pulmonary Vascular Physiology and Pathophysiology / Ed. E. K. Weir, J. T. Reeve. - New York: Marcel Dekker, 2009. - P. 241-290.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 25 Спосіб визначення мітохондріальної дисфункції клітин лейкоцитарної суспензії при патологічному процесі, що включає визначення характеру цитолізу лейкоцитів, який **відрізняється** тим, що додатково визначають відсоток активних форм кисню, що продукують лейкоцити, і відсоток клітин лейкоцитарної суспензії зі зниженим мітохондріальним трансмембранним потенціалом за даними цитофлуориметричного аналізу, причому
- 30 діагностичний висновок роблять за інтегральним індексом мітохондріальної дисфункції (I_{md}) за допомогою формули:

$$I_{md}=1000/r \cdot \mu \cdot \alpha, (1),$$

де

- 35 r - показник вмісту активних форм кисню, %;
 μ - число лейкоцитів із зниженим мітохондріальним трансмембранним потенціалом, %;
 α - показник рівня апоптозу, %.

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601