



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **74765** (13) **U**  
(51) МПК

**G01N 33/487** (2006.01)

**G01N 33/543** (2006.01)

**A61P 13/08** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: <b>u 2012 04953</b>	(72) Винахідник(и): <b>Драннік Георгій Миколайович (UA), Горпинченко Ігор Іванович (UA), Добровольська Людмила Іванівна (UA), Порошина Тетяна Вікторівна (UA), Нуріманов Каміль Раїсович (UA)</b>
(22) Дата подання заявки: <b>20.04.2012</b>	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>12.11.2012</b>	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>12.11.2012, Бюл.№ 21</b>	(73) Власник(и): <b>ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ УРОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ", вул. Ю. Коцюбинського, 9-а, м. Київ, 04053 (UA)</b>

## (54) СПОСІБ ВИЯВЛЕННЯ ТА ОЦІНКИ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ В СПЕРМАТОЗОЇДАХ ЕЯКУЛЯТУ

### (57) Реферат:

Спосіб виявлення та оцінки оксидативного стресу в сперматозоїдах еякуляту включає мікроскопічну оцінку забарвлення в реакції зв'язування та відновлення нітросинього тетразолію до депозитів диформазану темно-синього кольору під впливом активних форм кисню при оксидативному стресі. Визначають в забарвлених препаратах еякуляту процентний вміст диформазанпозитивних сперматозоїдів. Збільшення відсотка диформазанпозитивних сперматозоїдів, що містять малі, великі та дрібні темно-сині депозити відновленого дифармазану і займають більше 50 % цитоплазми сперматозоїда, свідчить про кількість сперматозоїдів, що перебувають в стані оксидативного стресу.

U  
UA 74765



Корисна модель належить до медицини, а саме до урології та клінічної імунології і може бути використана для виявлення та оцінки оксидативного стресу в сперматозоїдах еякуляту.

Відомо, що оксидативний стрес є однією з важливих характеристик еякуляту. Під впливом оксидативного стресу в сперматозоїдах активується перекисне окислення ліпідів плазматичної мембрани, ушкоджується структура мітохондріальної та геномної ДНК. Оксидативний стрес розвивається внаслідок "респіраторного вибуху" - різкого посилення кисневого метаболізму в активованих клітинах, результатом якого є утворення первинних ( $O_2^-$  супероксидний аніон, перекис водню  $H_2O_2$ , гідроксильний радикал  $OH$ , синглетний кисень  $^1\Delta q$  і  $^1\Sigma q+$ ) та вторинних метаболітів (гіпохлорна кислота  $HOCl$ , гіпохлорид  $ClO^-$  хлорамін, продукти перикисного окислення ліпідів) активних форм кисню за участю ферментів гексозомонофосфатного шунта, а саме НАДФН-оксидазної системи (NADPH-oxidase). Найбільш повно функціонування ферментів НАДФН-оксидазної системи описано для лейкоцитів, проте визначено, що подібні до лейкоцитарних, але з меншою активністю, вони присутні в багатьох типах клітин, у тому числі і в сперматозоїдах. При цьому ушкодження сперматозоїдів активними формами кисню під час оксидативного стресу відіграє істотну роль в патогенезі чоловічої неплідності.

Відомо, що для оцінки оксидативного стресу в еякуляті є luminol-залежний хемілюмінесцентний метод. [1], який включає визначення співвідношення активної форми кисню до антиоксидантної активності, тобто представлена повна характеристика неферментативної антиоксидантної активності та продукції активних форм кисню в еякуляті на luminometer-приладі.

Недоліком способу є те, що показник, оксидативного стресу в еякуляті отримують хемілюмінесцентним методом на luminometer-приладі, що обмежує широке використання методу в клінічній практиці, та не розраховують цей показник для лейкоцитів і сперматозоїдів в еякуляті.

Відомий також спосіб оцінки оксидативного стресу в лейкоцитах крові у хворих на хронічні захворювання легень за допомогою нітросинього тетразолію [2], який взятий за прототип, заснований на реакції зв'язування та відновлення нітросинього тетразолію до депозитів диформазану темно-синього кольору під впливом активних форм кисню при оксидативному стресі при мікроскопічному дослідженні лейкоцитів крові.

Недоліком способу є те, що спосіб використовують тільки для мікроскопічної оцінки оксидативного стресу в лейкоцитах крові.

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалити спосіб виявлення та оцінки оксидативного стресу в сперматозоїдах еякуляту шляхом мікроскопічного визначення в забарвлених препаратах еякуляту процентного вмісту сперматозоїдів, що містять малі, великі та дрібні темно-сині депозити відновленого дифармазану і займають більше 50 % цитоплазми сперматозоїда, а збільшення їх відсотка, свідчить про кількість сперматозоїдів, що перебувають в стані оксидативного стресу і може бути додатковим інформативним показником зниження фертильних властивостей еякуляту при екскреторно-токсичному неплідді.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб виявлення та оцінки активності оксидативного стресу в сперматозоїдах еякуляту, що включає мікроскопічну оцінку забарвлення в реакції зв'язування та відновлення нітросинього тетразолію до депозитів диформазану темно-синього кольору під впливом активних форм кисню при оксидативному стресі, згідно з корисною моделлю, визначають в забарвлених препаратах еякуляту процентний вміст диформазанпозитивних сперматозоїдів, при цьому збільшення відсотка диформазанпозитивних сперматозоїдів, що містять малі, великі та дрібні темно-сині депозити відновленого дифармазану і займають більше 50 % цитоплазми сперматозоїда, свідчить про кількість сперматозоїдів, що перебувають в стані оксидативного стресу.

Спосіб виявлення та оцінки оксидативного стресу в сперматозоїдах виконують наступним чином: в скляну центрифугальну пробірку напівавтоматичною піпеткою з наконечником разового використання додають 100 мікролітрів еякуляту та 100 мікролітрів 0,1 % розчину нітросинього тетразолію у фосфатному буфері (pH 7,2-7,4), проби ретельно розмішують та витримують 30 хвилин в термостаті при  $t$  37 °C. На знежиреному предметному склі змішують краплю проби з пробірки, додають краплю еозину (3 % розчин на дистильованій воді), добре розмішують та через 1 хвилину за допомогою пластикового шпателя або накривного скла легким рухом роблять мазок. Мазки повинні бути тонкими, рівномірними, займати не більше 2/3 предметного скла і закінчуватися "щіточкою". Мазок висушують на повітрі. Підрахування відсотка сперматозоїдів, які містять гранули диформазану темно-синього кольору, проводять під імерсійним об'єктивом ( $\times 900$  або  $\times 1000$ ). Забарвлення мазка - оранжево-червоний колір. Диформозанпозитивними вважають такі сперматозоїди, що містять малі, великі та дрібні темно-сині депозити відновленого дифармазану і займають більше 50 % цитоплазми сперматозоїда.

Практичне використання способу, що пропонується, проведено в лабораторії імунології та відділі сексопатології та андрології ДУ "Інститут урології НАМІ України". Визначення показників оксидативного стресу в сперматозоїдах проведено у 83 чоловіків репродуктивного віку (25-45 років), хворих на хронічний простатит, ускладнений екскреторно-токсичним непліддям.

Визначення продукції активних форм кисню сперматозоїдами за показниками мікроскопічної оцінки реакції зв'язування та відновлення нітросинього тетразолію до депозитів диформазау темно-синього кольору наведені в таблиці.

Як свідчать наведені в таблиці дані, за показниками мікроскопічної оцінки реакції зв'язування та відновлення нітросинього тетразолію до депозитів диформазау темно-синього кольору, для сперматозоїдів еякуляту здорових чоловіків, характерна низька генерація активних форм кисню, відсоток сперматозоїдів, в цитоплазмі яких малі, великі та дрібні темно-сині депозити відновленого диформазау складають  $15,5 \pm 4,2$  %. У хворих на хронічний простатит відсоток сперматозоїдів, 50 % цитоплазми яких містять гранули диформазау, складають 75,0 %  $\pm 16,3$  %, що більше за показники практично здорових чоловіків і може бути фактором формування патоспермії при екскреторно-токсичному неплідді.

Таблиця

Показники оксидативного стресу за вмістом депозитів диформазау в сперматозоїдах еякуляту хворих на хронічний простатит та здорових донорів

Групи обстежених	% сперматозоїдів, які містять депозити диформазау	Статист, показник Р
Хворі на хронічний простатит n=83	$75,0 \pm 16,3$	<0,01
Здорові донори n=10	$15,5 \pm 4,2$	

Наводимо приклади застосування запропонованого способу.

Приклад 1. Хв. С, тем. карта № 475/11. Діагноз підгострий хронічний простатит, екскреторно-токсичне непліддя поставлений хворому на підставі клініко-лабораторного обстеження. За результатами тесту на нітросиній тетразолій відсоток сперматозоїдів, в цитоплазмі яких присутні депозити диформазау, за запропонованим способом складає 65 %. Тобто, 65 % сперматозоїдів еякуляту перебувають в умовах оксидативного стресу що може негативно впливати на фертильні властивості еякуляту.

Приклад 2. Хв. Б., тем. карта № 226/11. Діагноз: хронічний простатит, екскреторно-токсичне непліддя. За результатами тесту на нітросиній тетразолій відсоток сперматозоїдів, в цитоплазмі яких присутні депозити диформазау, за запропонованим способом складає 15 %. Тобто, лише 15 % сперматозоїдів еякуляту перебувають в умовах оксидативного стресу, тобто антиоксидативна активність та продукція активних форм кисню збалансовані та оксидативний стрес сперматозоїдів не є складовою формування екскреторно-токсичного непліддя.

Таким чином, спосіб виявлення та оцінки оксидативного стресу в сперматозоїдах еякуляту за показниками мікроскопічної оцінки реакції зв'язування та відновлення нітросинього тетразолію до депозитів диформазау темно-синього кольору є простий у виконанні та дає можливість визначити відсоток сперматозоїдів в стані оксидативного стресу і може бути додатковим інформативним показником формування екскреторно-токсичного непліддя.

Джерела інформації:

1. Esfandiari N. Utility of the Nitroblue Tetrazolium Reduction Test for Assessment of Reactive Oxygen Species Production by Seminal Leukocytes and Spermatozoa / N. Esfandiari, R. K, Sharma, R. A. Saleh [et al.] // Journal of Andrology.-2003. - Vol. 24. - № 6.

2. Шмелев Е.И. К оценке теста восстановления нитросинего тетразолия у больных с хроническим заболеванием легких. /Е.Г.Шмелев, Т.К.Бумагина, Ю.Г. Митерев // Лабораторное дело.-1979. - № 9. - С. 524-528.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб виявлення та оцінки оксидативного стресу в сперматозоїдах еякуляту, що включає мікроскопічну оцінку забарвлення в реакції зв'язування та відновлення нітросинього тетразолію до депозитів диформазау темно-синього кольору під впливом активних форм кисню при оксидативному стресі, який **відрізняється** тим, що визначають в забарвлених препаратах еякуляту процентний вміст диформазау-позитивних сперматозоїдів, при цьому збільшення

відсотка диформазапозитивних сперматозоїдів, що містять малі, великі та дрібні темно-сині депозити відновленого дифармазану і займають більше 50 % цитоплазми сперматозоїда, свідчить про кількість сперматозоїдів, що перебувають в стані оксидативного стресу.

---

Комп'ютерна верстка Л. Купенко

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

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