



УКРАЇНА

(19) UA (11) 19432 (13) U
(51) МПК (2006)
G01N 33/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ ОКИСЛЮВАЛЬНОГО СТРЕСУ У ХВОРИХ НА РАК ГОРТАНІ

1

(21) u200606898

(22) 20.06.2006

(24) 15.12.2006

(46) 15.12.2006, Бюл. № 12, 2006 р.

(72) Воронцова Лоліта Леонідівна

(73) ЗАПОРІЗЬКА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ ПІСЛЯ-
ДИПЛОМНОЇ ОСВІТИ, Воронцова Лоліта Леонідів-
на(57) Спосіб діагностики окислювального стресу у
хворих на рак гортані, що включає біохімічне ви-
значення пошкоджених білків, який відрізняється

2

тим, що визначення проводять у плазмі крові, при-
чому до 0,1 мл плазми додають 2,8 % розчин
FeSO₄ та 0,2 мл фізіологічного розчину, проводять
інкубацію протягом 2 годин при температурі 37°C,
додають тетрахлороцтову кислоту, центрифугують
30 хв. при 3000 об/хв., а у отриманому осаді мето-
дом спектрофотометрії визначають кількість білків
альдегідних (при довжині хвилі 270 нм) та карбок-
сильних (при довжині хвилі 363 нм) груп і при під-
вищенні їх нормальної кількості діагностують оки-
слювальний стрес.

Корисна модель стосується медицини, а саме
клінічної лабораторної діагностики та онкології і
може бути використана для діагностики окислюва-
льного стресу у хворих на рак гортані та як об'єк-
тивний критерій вибору тактики післяопераційної
терапії.

Існує багато способів діагностики окислюваль-
ного стресу, але вони недостатньо ефективні, що
викликає необхідність пошуку нових засобів.

Відомий спосіб оцінки ступеня вираженості
окислювального стресу, що полягає у визначенні
кінцевого продукту перекисного окислення ліпідів -
малонового діальдегіду [Андреева Л.И., Кожемя-
кин Л.А., Кишку Л.А. Модификация метода опре-
деления перекисей липидов в тесте с тиобарбиту-
ровой кислотой // Лаб. дело. - 1996. - №11. - с.41-
46].

Спосіб включає дослідження рівня тіобарбету-
рових активних сполук у сироватці крові, які є ві-
дображенням активації процесів пероксидації ліпі-
дів (малоновий діальдегід, як один з маркерів
окислювального стресу).

Спосіб здійснюється таким чином: до 0,3мл
свіжої сироватки, додають ортофосфорну та тіо-
барбітурову кислоти, а потім - сульфат заліза. Ви-
тримують протягом 1 години на водяній бані. До-
дають 4мл бутанолу та ретельно перемішують.
Центрифугують 10 хвилин при 3000об/хв, що дає
зможу провести розподіл зразку на фракції.

З верхньої фракції (бутанолової) відбирають
пробу й проводять фотометрування при довжині
хвилі у 530нм.

Спільною суттєвою ознакою аналогу і корисної
моделі, що заявляється, є таке:

- методи дослідження є біохімічними;
- використовують центрифугування та спектро-
фотометрію.

Цей спосіб є недостатньо ефективним тому,
що:

- окислювальний стрес оцінюється тільки на
рівні пероксидації ліпідів;
- підвищення рівня малонового діальдегіду
проявляється лише на пізніх стадіях розвитку оки-
слювального стресу.

Найбільш близьким за технічною сутністю та
результатами, що досягаються, є спосіб, який по-
лягає у визначенні рівня продуктів білкового кросс-
лінкінгу [Matsumoto K., Ikeda K., Horiuchi S. et al.
Immunochemical evidence for increased formation of
advanced glycation end products and inhibition by
aminoguanidine in diabetic rat lenses // Biochem.
Biophys. Res. Commun. - 1997. - Vol. 241. - P. 352-
354].

Спосіб включає в себе кілька етапів:

1. Проведення електрофорезу сироватки крові
на гелевій пластині;

2. Фіксація та виявлення фракцій за рахунок
барвників;

3. Кількісна оцінка пошкоджених білків.

Спільними суттєвими ознаками прототипу і ко-
рисної моделі, що заявляється, є такі:

- методи дослідження є біохімічними;
- кількісна оцінка пошкоджених білків;
- діагностика наявності окислювального стресу

(13) U
19432
(11)
(19) UA

за рахунок виявлення пошкоджених білків.

Цей спосіб є недостатньо ефективним тому, що:

- є складним;
- потребує певних навичок в роботі з приготування гелевих пластин при проведенні електрофорезу;
- є досить дорогим;
- потребує багато часу на фіксацію та покраску;
- накопичення та визначення продуктів білкового кросс-лінкінгу можливе лише в тих випадках, коли захворювання супроводжується морфологічними змінами клітин крові;
- є інформативним лише на пізніх стадіях розвитку захворювання.

В основу запропонованої корисної моделі поставлено задачу розробки способу діагностики найбільш ранніх проявів окислювального стресу у хворих на рак гортані, який дасть можливість використовувати знайдені показники як об'єктивні критерії вибору тактики післяопераційного лікування цих хворих.

Поставлена задача вирішується за рахунок того, що у способі діагностики окислювального стресу, який включає біохімічне визначення кількості пошкоджених білків. Його проводять у плазмі крові, причому, до 0,1мл плазми додають 2,8% розчин FeSO_4 та 0,2мл фізіологічного розчину. Після цього проводять інкубацію протягом 2 годин при температурі у 37°C , додають тетрахлоруксусну кислоту, центрифугують 30хв. при 3000об/хв. У отриманому осаді методом спектрофотометрії визначають кількість білків альдегідних (при довжині хвилі 270нм) та карбоксильних (при довжині хвилі 363нм) груп. При підвищенні їх нормальної кількості діагностують окислювальний стрес.

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю ознак, що заявляються, та технічним результатом полягає у такому:

- окислювальне пошкодження білків реєструється раніше ніж продуктів білкового кросс-лінкінгу

та малонового діальдегіду;

- є недорогим та легким у виконанні;
- є інформативним, тому що вимірюються альдегідні та карбоксильні групи (270нм та 360нм), що дає змогу більш повно судити про вираженість окислювального стресу;
- показник може бути використаним як маркер окислювального стресу у хворих на рак гортані.

Спосіб здійснюється таким чином: до 0,1мл плазми додають 0,1мл 2,8% розчину сульфату заліза та 0,2мл фізіологічного розчину. Проводять інкубацію протягом 2-х годин при температурі 37°C . Додають 0,1мл 20% розчину тетрахлоруксусної кислоти, центрифугують 30 хвилин при 3000об/хв. Надосадкову рідину зливають, а осад промивають 3мл етилацетату. Сушать. До осаду додають 3мл 8М сечовини й 1мл 2М хлорної кислоти.

Проводять спектрофотометрію проби при довжині чвилі 270нм (виявлення альдегідної групи) та 360нм (виявлення карбоксильної групи).

Приклад 1. Хворий Н., 65 років, діагноз: рак гортані Т3NxM0.

У хворого до операції, у першу та третю добу після операції. З венозної крові виділили плазму та сироватку, які досліджували для визначення кількості малонового альдегіду й кількості білкових альдегідних та карбоксильних груп.

До операції вміст карбоксильних груп у білках підвищений, тоді як рівень малонового діальдегіду не відрізнявся від показників норми.

У першу добу післяопераційного періоду спостерігали підвищення карбоксильних груп до $2,43\text{нмоль/мг}$ (при нормі $0,72\pm 0,15\text{нмоль/мг}$), рівень малонового діальдегіду не відрізнявся від показників норми. На третю добу зміни прогресували (до того ж було виявлено підвищення рівня малонового діальдегіду до $3,5\text{мкмоль/л}$ при нормі $1,6\pm 0,4\text{мкмоль/л}$).

Таким чином, запропонований спосіб дозволяє діагностувати окислювальний стрес на більш ранніх етапах розвитку.