



УКРАЇНА

(19) UA (11) 41442 (13) U
(51) МПК (2009)
G01N 33/48

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ РАННІХ ПРОЯВІВ ОКИСЛЮВАЛЬНОГО СТРЕСУ

1

2

(21) u200814154

(22) 08.12.2008

(24) 25.05.2009

(46) 25.05.2009, Бюл.№ 10, 2009 р.

(72) ВОРОНЦОВА ЛОЛІТА ЛЕОНІДІВНА, UA

(73) ЗАПОРІЗЬКА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ ПІСЛЯ-
ДИПЛОМНОЇ ОСВІТИ, UA

(57) Спосіб визначення ранніх проявів окислюва-
льного стресу, що включає введення речовини,

яка поглинається клітинами, інкубацію, центрифугування, підрахування клітин, що поглинули речовину, розрахунок ступеня активації клітин фагоцитарної ланки, який **відрізняється** тим, що підраховують тільки 50 нейтрофілів у стані поглинання і визначають індекс активації нейтрофілів (НСТ-тест), причому різке зростання НСТ-тесту свідчить про наявність ранніх проявів окислювального стресу.

Корисна модель стосується медицини, а саме клінічної лабораторної діагностики і може бути використана для визначення ранніх проявів окислювального стресу як об'єктивний критерій вибору тактики післяопераційної терапії.

Існує багато способів визначення окислювального стресу, але вони не дозволяють визначити ранні його прояви, 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., Кожемякин Л.А., Кишкун Л.А. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой // Лаб. дело. - 1996. -- №11. - С. 41 - 46).

Спосіб включає дослідження рівня тіобарбітурових активних сполук у сироватці крові, які є відображенням активації процесів пероксидації ліпідів (малоновий діальдегід як один з маркерів окислювального стресу).

Спосіб здійснюється таким чином: до 0,3 мл свіжої сироватки додають ортофосфорну та тіобарбітурову кислоти, а потім - сульфат заліза. Витримують протягом 1 години на водяній бані. Додають 4 мл бутанола та ретельно перемішують. Центрифугують 10 хвилин при 3000 об/хв, що дає змогу провести розподіл зразку на фракції.

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

Цей спосіб є недостатньо ефективним тому, що не дозволяє визначити ранні прояви окислювального стресу.

Найбільш близьким за технічною сутністю, є спосіб, який полягає в визначенні функціонального стану лейкоцитів, що є основною компонентою перекисного окислення ліпідів (Васильєв Н.В., Одинцов Ю.Н., Федоров Ю.В. Определение фагоцитарной реакции нейтрофильных лейкоцитов крови. -1972.-24 с.).

Спосіб включає в себе кілька етапів: лейкоконцентрат виділяють з венозної крові, додають гепарин. Кров перемішують, інкубують 30хв при температурі 37 °С та відбирають дозатором 0,5 мл з зони на кордоні з еритроцитами (це й є лейкоконцентрат). До пробірки додають 0,25 мл речовини, що поглинається клітинами. Отриману суміш інкубують 5 хв при температурі 37 °С, центрифугують. Осад ресуспензують і роблять з нього мазки, які висушують та фіксують. Підраховують 100 нейтрофілів та 50 моноцитів, які поглинули речовину. Через 30 хв знов роблять мазки та підраховують в них 100 нейтрофілів та 50 моноцитів, які перетравили речовину, що поглинули. Підраховують ступень активації клітин фагоцитарної ланки.

Спільними суттєвими ознаками прототипу і корисної моделі, що заявляється, є такі:

- додавання до лейкоконцентрату речовини, що поглинається клітинами;

- підрахування клітин, що поглинули речовину;

- розрахунок ступеня активації клітин фагоцитарної ланки. Цей спосіб є недостатньо ефективним тому, що:

- потребує певних навичок в роботі з мікробною тест-культурою та багато часу на підрахунок кількості клітин з ознаками фагоцитозу

(19) UA (11) 41442 (13) U

та оцінки поглинаючої та перетравлюючої здібностей.

В основу запропонованої корисної моделі поставлено задачу розробки способу визначення ранніх проявів окислювального стресу, що дасть можливість використовувати ці показники як об'єктивні критерії вибору тактики післяопераційного лікування хворих.

Поставлена задача вирішується за рахунок того, що у способі ранньої діагностики окислювального стресу досліджується функціональний стан дихального вибуху лейкоцитів (НСТ-тест).

Його проводять у венозній крові з гепарином. В пробірку набирають 0,025 мл буферного розчину та 0,025 мл 0,15 % розчину НСТ (нітросиній тетразолій). В подальшому вміст пробірки струшують та інкубують на водяній бані при 37 °С про-

тягом 30 хв. Осад ресуспензують та роблять з нього мазки.

В кожному мазку під мікроскопом підраховують 50 нейтрофілів для визначення відсотку клітин, які вміщують включення діфармазану.

Розраховують індекс активації нейтрофілів (ІАН) за формулою:

$$ІАН = \frac{A \times 0 + B \times 1 + C \times 2 + D \times 3}{100}$$

де А - кількість клітин, що не містять відкладень діфармазону; В, С, D - кількість клітин, що містять гранули діфармазану в тих або інших кількостях. Цифри указують на ступінь заповнення цитоплазми гранулами діфармазану (1 - площа відкладень діфармазана не перевищує 1/3 площі ядра; 2 - площа відкладень діфармазана займає від 1/3 до всієї площі ядра; 3 - відкладення діфармазану за площею перевищують площу ядра).

Приклад 1. Хворий Н., 30 років, діагноз: рак гортані Т₃N_xM₀.

показники	донори	доопераційні	1 доба	7 доба	21 доба
МДА, мкмоль/л	10,5 ± 0,4	15,5 ± 0,5	7,2 ± 0,1	6,3 ± 0,4	8,4 ± 0,7
ФІН ₃₀	67,5 ± 4,1	59,3 ± 4,4	55,1 ± 3,8	57,2 ± 3,2	60,4 ± 2,2
НСТ сп., у.о.	1,2 ± 0,01	1,5 ± 0,01	0,9 ± 0,02	1,4 ± 0,04	1,7 ± 0,01,

Виявлене різке підвищення рівня НСТ-тесту на 7 добу після операції є ознакою прояву, що початку розвитку окислювального стресу. Решта

досліджень показників дає можливість виявити початок окислювального стресу значно пізніше (наприклад, на 21 добу).