



УКРАЇНА

(19) UA (11) 60157 (13) A
(51) 7 G01N33/50МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДВИДАЄТЬСЯ ПІД
ВІДПОВІДАЛЬНІСТЬ
ВЛАСНИКА
ПАТЕНТУ

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВАЦІЇ ПРОЦЕСІВ ЛІПОПЕРОКСИДАЦІЇ В КРОВІ ЛЮДИНИ

1

2

(21) 2003021298

(22) 13 02 2003

(24) 15 09 2003

(46) 15 09 2003, Бюл. № 9, 2003 р.

(72) Носач Олена Василівна, Овсяннікова Людмила Михайлівна

(73) НАУКОВИЙ ЦЕНТР РАДІАЦІЙНОЇ МЕДИЦИНИ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ

(57) 1 Спосіб визначення активації процесів ліпопероксидації в крові людини, що включає визна-

чення в плазмі крові вмісту продуктів, що реагують з 2-тіобарбітуровою кислотою, без додавання (T_6) та при додаванні (T_c) в реакційне середовище розчину сірчанокислоного заліза, який відрізняється тим, що при значеннях T_6 , більших ніж $(3,17+0,29 \times T_c)$, визначають активацію процесів ліпопероксидації

2 Спосіб за п 1, який відрізняється тим, що при розрахунку T_6 і T_c враховують різницю екстинкцій бутанольної фази при довжині хвилі 535 і 580 нм

Винахід стосується медицини, зокрема клінічної біохімії. Спосіб може бути використаний для визначення активації процесів ліпопероксидації в крові людини при патологічних станах.

Відомий спосіб визначення активації процесів ліпопероксидації в сироватці крові на підставі розрахунку фактора ризику пероксидації ліпідів (Чевари С., Андял Т., Панцел А. Иницирование перекисного окисления липидов в сыворотке крови in vivo // Клин. лаб. диагностика - 1992 - №11-12 - С 34-37). Спосіб полягає у визначенні співвідношення між рівнем малонового діальдегиду та концентрацією холестерину за ініціації процесів ліпопероксидації іонами заліза (II) при насиченні проби киснем.

Недоліком відомого способу є те, що зміни вмісту продуктів ліпопероксидації в плазмі хворих оцінюють при порівнянні з відповідними змінами в сироватці крові здорових осіб в той час, як індивідуальні коливання вмісту продуктів ліпопероксидації мають широкий діапазон і змінюються не тільки при патологічних станах, а й на різних етапах розвитку процесів адаптації, що звужує область його застосування. Для здійснення способу потрібен спеціальний пристрій та компресор, що обмежує можливість його використання в клінічній практиці.

Відомий спосіб визначення активації процесів ліпопероксидації шляхом оцінки пероксидного потенціалу ліпопротеїдів плазми, який дозволяє оцінити чутливість до ліпопероксидації та полягає у визначенні вмісту продуктів пероксидації жирних кислот (малонового діальдегиду) і холестерину

(переважно оксиду холестеролу) до та після інкубації 0,3-0,5 мл плазми крові в присутності перекису водню та ацетату міді (Plasma lipoprotein peroxidation potential a test to evaluate individual susceptibility to peroxidation / Arshad M A, Bhadra S, Cohen R M, Subbiah M T // Clin. Chem - 1991 - Vol 37, № 10 (Pt 1) - P 1756-1758).

Недоліком відомого способу, як і попереднього, є те, що зміни вмісту продуктів пероксидації ліпідів плазми хворих оцінюють при порівнянні з відповідними змінами в плазмі крові здорових осіб. Необхідність використання складного газоаналізуючого обладнання для визначення продуктів пероксидації холестерину ускладнює застосування способу.

Відомий також, обраний як прототип, спосіб визначення активації процесів ліпопероксидації на підставі визначення вмісту малонового діальдегиду в реакції з 2-тіобарбітуровою кислотою з урахуванням екстинкції забарвленого триметилового комплексу при довжині хвилі 532 та 580 нм (Біохімічні та біофізичні методи оцінки порушень окислювального гомеостазу в осіб, що зазнали радіаційного впливу внаслідок аварії на ЧАЕС. Метод рекомендації / Овсяннікова Л. М., Альохіна С. М., Дробінська О. В., Атаманенко О. М., Ляшенко Л. О., Квіта Г. І. - К. Чорнобильінтерінформ, 1999 - с. 18).

Недоліком відомого способу є недостатня чутливість визначення активації процесів ліпопероксидації в діапазоні значень, що не перевищують показники середньостатистичної норми.

В основу винаходу поставлено задачу підвищення чутливості способу визначення активації

(13) A
(11) 60157
(19) UA

процесів ліпопероксидації шляхом порівняння базального рівня вмісту продуктів, що реагують з 2-тіобарбітуровою кислотою (ТБК-АП), і показника, який залежить від рівня утворення цих сполук після додавання в реакційне середовище іонів заліза (II). Це надасть можливість визначати активацію процесів ліпопероксидації в тих випадках, коли показники базального вмісту ТБК-АП не перевищують значень середньостатистичної норми.

Тут і далі аббревіатурою ТБК-АП позначено сполуки, що при реакції з 2-тіобарбітуровою кислотою утворюють забарвлені комплекси. Вміст ТБК-АП, що визначається без додавання в реакційне середовище іонів заліза (II) позначено як базальний вміст (T_b). Вміст ТБК-АП, що визначається після додавання в реакційне середовище іонів заліза (II) позначено як стимульований вміст (T_c). Переважно більшість цих сполук становить малоновий діальдегід - вторинний продукт ліпопероксидації.

В плазмі крові здорових осіб існує стаке співвідношення між показниками T_b і T_c . Підтримання цього співвідношення забезпечується функціонуванням антиоксидантної системи організму. Якщо при активації процесів вільнорадикального окислення спроможність антиоксидантної системи є недостатньою для захисту ліпідів від дії вільнорадикальних сполук, посилення процесів ліпопероксидації призводить до накопичення вторинних продуктів ліпопероксидації, зокрема, малонового діальдегіду. Це супроводжується зменшенням рівня вмісту ліпідів, що можуть окислитися за дії про-оксидантних факторів. В такому випадку при додаванні в реакційне середовище іонів заліза (II) рівень T_c є нижчим за той, який міг би бути при незміненому рівні вмісту цих ліпідів.

При дослідженні процесів ліпопероксидації у практично здорових осіб встановлено, що співвідношення між T_b і T_c описується рівнянням

$$T_b = 3,17 + 0,29 \times T_c,$$

де T_b - базальний вміст ТБК-АП, нмоль/мл,

"3,17" - коефіцієнт інтерцепції,

"0,29" - коефіцієнт лінійної регресії,

T_c - стимульований вміст ТБК-АП, нмоль/мл.

Технічна задача вирішується за рахунок того, що порівнюють T_c та T_b і при рівні останнього більшому ніж (3,17 + 0,29) визначають активацію процесів ліпопероксидації.

T_b визначають наступним чином: до 0,15мл плазми крові (без гемолізу) додають 3мл 1% ортофосфорної кислоти (рН=2,0), 1мл 0,6% розчину 2-тіобарбітурової кислоти та 0,05мл дистильованої води, після ретельного перемішування закриті пробками пробірки ставлять на киплячу водяну баню на 1 годину, потім пробірки охолоджують в холодній воді та додають 2мл бутанолу. Після того пробірки ретельно перемішують і центрифугують протягом 10 хвилин при 3000об/хв. Потім визначають оптичну густину верхньої (бутанольної) фази на спектрофотометрі при довжині хвилі 535 і

580нм з використанням в якості оптичного контролю бутанолу. Розрахунок вмісту T_b проводять за формулою

$$T_b = 85,47 \times \Delta E.$$

де T_b - базальний вміст ТБК-АП, нмоль/мл,

"85,47" - розрахунковий показник, що включає об'єм плазми, об'єм пробірки, коефіцієнт молярної екстинкції малонового діальдегіду та коефіцієнт перерахунку, нмоль/мл,

ΔE - різниця екстинкцій бутанольної фази при $\lambda = 535\text{нм}$ і $\lambda = 580\text{нм}$, в одиницях оптичної густини.

T_c визначають за методикою описаною вище для визначення фактичного вмісту ТБК-АП, але замість 0,05мл дистильованої води до реакційної суміші додають 0,05мл розчину сірчанокислого заліза, приготованого з розрахунку 28мг $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ на 10мл дистильованої води.

Перевагою способу, на відміну від прототипу, є те, що він дозволяє визначати активацію процесів ліпопероксидації тоді, коли значення T_b не перевищують межі середньостатистичної норми і для цього не треба проводити повторні дослідження. Чутливість способу становить 90%.

Приклад 1. Пацієнт Б, 45 р, учасник ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС 1986-1987рр. T_b в плазмі крові становив 4,87нмоль/мл. T_c - 5,47 нмоль/мл. Проводимо розрахунок

$$3,17 + 0,29 \times T_c = 3,17 + 0,29 \times 5,47 = 4,76$$

Порівнюємо T_b з розрахованим значенням. Значення T_b є вищим за розраховане значення. На підставі цього робимо висновок про наявність активації процесів ліпопероксидації. При подальшому дослідженні зразка крові в ізопропанольній фазі ліпідного екстракту визначено підвищення вмісту дієнових і оксодієнових кон'югатів (первинні та проміжні продукти ліпопероксидації), а також основ Шиффа (кінцеві продукти ліпопероксидації - індикатори дистрофічних процесів).

Приклад 2. Пацієнт Л, 48 р, учасник ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС 1986-1987рр. T_b в плазмі крові становив 5,04нмоль/мл. T_c - 9,74 нмоль/мл. Проводимо розрахунок

$$3,17 + 0,29 \times T_c = 3,17 + 0,29 \times 9,74 = 5,99$$

Порівнюємо T_b з розрахованим значенням. Значення T_b є нижчим за розраховане значення. Робимо висновок про відсутність активації процесів ліпопероксидації. При подальшому дослідженні зразка крові встановлено, що рівень вмісту дієнових, оксодієнових кон'югатів і основ Шиффа в ізопропанольній фазі ліпідного екстракту крові знаходився в межах норми.

Приклад 3. Пацієнт Р, 39р, учасник ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС 1986р. T_b в плазмі крові становив 5,04нмоль/мл. T_c - 5,64 нмоль/мл. Проводимо розрахунок

$$3,17 + 0,29 \times T_c = 3,17 + 0,29 \times 5,64 = 4,80$$

Порівнюємо T_b з розрахованим значенням. Значення T_b є вищим за розраховане значення. Робимо висновок про наявність активації процесів ліпопероксидації.

нюємо T_6 з розрахованим значенням значення T_6 є вищим за розраховане значення. На підставі цього робимо висновок про наявність активації процесів ліпопероксидації. При подальшому дослідженні зразка крові в ізопропанольній фазі ліпідного екстракту визначено підвищення вмісту дієнових кон'югатів (первинні продукти ліпопероксидації).

Приклад 4. Пацієнтка Щ., 55р., евакуйована з Прип'яті в 1986р. T_6 в плазмі крові становив 6,84 нмоль/мл. T_c – 8,20 нмоль/мл. Проводимо розрахунок:

$$3,17 + 0,29 \times T_c = 3,17 + 0,29 \times 8,20 = 5,55 \quad \text{Порів-}$$

нюємо T_6 з розрахованим значенням значення T_6 є вищим за розраховане значення. На підставі цього робимо висновок про наявність активації процесів ліпопероксидації. При подальшому дослідженні зразка крові в ізопропанольній фазі ліпідного екстракту визначено підвищення вмісту основ Шиффа (кінцеві продукти ліпопероксидації).

Спосіб може бути використаний в установах охорони здоров'я для визначення активації процесів ліпопероксидації в плазмі крові людини при патологічних станах, а також для контролю за перебігом процесів ліпопероксидації при використанні засобів з антиоксидантною дією.