



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) UA

(11) 102129

(13) U

(51) МПК

G01N 33/48 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: а 2013 11933

(22) Дата подання заявки: 10.10.2013

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: 26.10.2015

(41) Публікація відомостей
про заявку: 10.01.2014, Бюл.№ 1

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: 26.10.2015, Бюл.№ 20

(72) Винахідник(и):

Гавриленко Тетяна Іллівна (UA),
Рижкова Наталія Олександрівна (UA),
Підгайна Олена Анатоліївна (UA),
Торбас Олена Олександрівна (UA),
Бабій Тетяна Вікторівна (UA),
Лутай Ярослав Михайлович (UA),
Довгань Наталя Володимирівна (UA),
Степура Анатолій Олександрович (UA),
Сопко Олександр Олександрович (UA)

(73) Власник(и):

НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР
"ІНСТИТУТ КАРДІОЛОГІЇ ІМЕНІ
АКАДЕМІКА М.Д. СТРАЖЕСКА"
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ
НАУК УКРАЇНИ,
вул. Народного Ополчення, 5, м. Київ,
03151 (UA)

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ СУПЕРОКСИДАНІОНУ В НЕЙТРОФІЛЬНИХ ГРАНУЛОЦИТАХ

(57) Реферат:

Спосіб визначення активності супероксиданіону в нейтрофільних гранулоцитах включає інструментальні дослідження периферійної крові, визначення фотометричних характеристик зразка та оцінку діагностичних критеріїв. Виділяють із досліджуваного зразка крові чисту популяцію нейтрофільних гранулоцитів, додають у зразок з цими клітинами розчин нітросинього тетразолію, інкубують протягом 15 хв. Вимірюють інтенсивність забарвлення на імуноферментному аналізаторі та визначають активність супероксиданіону по кількості утвореного формазану (ммоль/л) по формулі:

$A \text{ (моль/л)} = \Delta E / \epsilon \times l$,

де:

A - активність супероксиданіону;

ΔE - різниця оптичних щільностей контрольного та дослідного зразків;

ϵ - коефіцієнт молярної екстинції формазану ($3,79 \times 10^4$);

l - товщина шару.

UA 102129 U

Корисна модель належить до медицини, а саме до способів аналізу крові, і може бути використана у лабораторній діагностиці.

Відомий спосіб визначення супероксиданіону (COA) в лейкоцитах крові (див. Park B.H., Fikrig S.M., Smithwich E.M. Infection and nitrobluetetrazolium reduction by neutrophils; a diagnostic aid // Lancet. - 1968. - Vol. 11. - № 2. - P. 532-534), за яким мазки крові інкубують з нітросинім тетразолієм протягом 15 хв., змивають надлишок, висушують, фіксують метанолом, після промивання підфарбовують ядра 5 % водним розчином сафраніну 1 хв., потім під мікроскопом підраховують відсоток клітин з утвореними темно-синіми гранулами формазану.

Недоліком такого способу є його низька специфічність, складність та багатостадійність, що значно знижує об'єктивність показника та потребує багато часу для виконання методики.

Відомий спосіб визначення супероксиданіону в клітинній суспензії (Murphy CT, Moloney G, Hall LJ, Quinlan A, Faivre E, Casey P, Shanahan F, Melgar S, Nally K. Use of bioluminescence imaging to track neutrophil migration and its inhibition in experimental colitis // Clin Exp Immunol. - 2010. - 162(1). - P. 188-196) методом хемілюмінесценції, за яким до клітинної суспензії додають люцигенін та вимірюють інтенсивність свічення, по ступеню якої роблять висновок про активність кисневих радикалів.

Недоліком такого способу є те, що спонтанна хемілюмінесценція клітин дуже низька і потребує, з однієї сторони, індукторів типу люцигенін, а з іншої, великої кількості біологічного матеріалу, що у відношенні до нейтрофілів не прийнятно. Крім цього, люцигенінзалежна хемілюмінесценція залежить не тільки від концентрації люцигеніну та супероксианіону, але і окислення люцигеніну може давати супероксидні радикали. Цей метод потребує також наявності дороговартісного обладнання (хемілюмінометр), що обмежує сферу застосування способу.

В основу корисної моделі поставлена задача створення способу визначення супероксиданіону у нейтрофільних гранулоцитах, в якому за рахунок зменшення стадій обробки зразка, застосування нових дій та нових речовин забезпечується спрощення реалізації способу та підвищення достовірності оцінки.

Для вирішення поставленої задачі спосіб визначення супероксиданіону у нейтрофільних гранулоцитах включає виділення з крові чистої популяції нейтрофільних гранулоцитів.

Новим у способі є те, що додають у зразок з клітинами нейтрофільних гранулоцитів нітросиній тетразолій, вимірюють інтенсивність забарвлення на імуноферментному аналізаторі та визначають активність супероксиданіону по кількості утвореного формазану.

Внаслідок застосування у аналізі нових дій та нових речовин підвищується достовірність оцінки за рахунок забезпечення стійкого забарвлення, зменшення впливу на забарвлення другорядних факторів. Зменшення стадій обробки зразка спрощує реалізацію способу та прискорює проведення дослідження.

В окремих варіантах реалізації способу інтенсивність забарвлення зразка вимірюють за допомогою імуноферментного аналізатора та по формулі вираховують кількість утвореного формазану.

Застосування таких особливостей додатково спрощує реалізацію способу та прискорює проведення дослідження.

При здійсненні способу у прикладах застосовувалась центрифуга LMC-4200R (Biosan, Латвія), 0,1 % розчин нітросинього тетразолію у фосфатному буфері, 0,1N HCl, диметилсульфоксид та імуноферментний аналізатор iEMS Labsystem (Фінляндія).

При проведенні дослідження у прикладах з периферійної крові виділяли чисту популяцію нейтрофільних гранулоцитів центрифугуванням на подвійному градієнті щільності (1.076 та 1.120), осаджували в полістиролових планшетах в концентрації 1×10^6 /л, надлишок зливали, потім у отриманий зразок з клітинами нейтрофільних гранулоцитів додавали 0,2 мл 0,1 % розчин нітросинього тетразолію, через 15 хв. зупиняли реакцію 0,1N HCl, додавали диметилсульфоксид та після інкубації в термостаті протягом 1 год. вимірювали інтенсивність забарвлення на імуноферментному аналізаторі та визначали активність супероксиданіону по кількості утвореного формазану (ммоль/л) по формулі:

$$A \text{ (моль/л)} = \Delta E / \epsilon \times l,$$

де:

55 A - активність супероксиданіону;

ΔE - різниця оптичних щільностей контрольного та дослідного зразків;

ϵ - коефіцієнт молярної екстинції формазану ($3,79 \times 10^4$);

l - товщина шару.

Спосіб ілюструється прикладами його застосування.

Приклад 1. Пацієнт М., 45 р. Було проведено дослідження та визначено вміст супероксиданіону у нейтрофільних гранулоцитах. Рівень супероксиданіону складав 6,2 ммоль/л (тобто нормальний). Висновок - людина здорова.

5 Приклад 2. Хворий Г., 54 р. Було проведено дослідження та визначено вміст супероксиданіону у нейтрофільних гранулоцитах. Рівень перекису водню складав 2,1 ммоль/л. Тобто рівень супероксиданіону низький. Діагноз - гострий інфаркт міокарду.

10 Приклад 3. Хворий К. 20 р. Було проведено дослідження та визначено вміст супероксиданіону у нейтрофільних гранулоцитах. Рівень супероксиданіону складав 16,9 ммоль/л. Тобто рівень супероксиданіону високий. Діагноз - гострий ендокардит.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб визначення активності супероксиданіону в нейтрофільних гранулоцитах, що включає інструментальні дослідження периферійної крові, визначення фотометричних характеристик зразка та оцінку діагностичних критеріїв, який **відрізняється** тим, що виділяють із досліджуваного зразка крові чисту популяцію нейтрофільних гранулоцитів, додають у зразок з цими клітинами розчин нітросинього тетразолію, інкубують протягом 15 хв., вимірюють інтенсивність забарвлення на імуноферментному аналізаторі та визначають активність супероксиданіону по кількості утвореного формазау (ммоль/л) по формулі:

20
$$A \text{ (моль/л)} = \Delta E / \varepsilon \times l,$$

де:

A - активність супероксиданіону;

ΔE - різниця оптичних щільностей контрольного та дослідного зразків;

ε - коефіцієнт молярної екстинції формазау ($3,79 \times 10^4$);

25 l - товщина шару.

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

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

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