



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 102130

(13) U

(51) МПК

G01N 33/48 (2006.01)

G01N 33/483 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

- (21) Номер заявки: а 2013 11934
(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 АКТИВНОСТІ МІЕЛОПЕРОКСИДАЗИ НЕЙТРОФІЛЬНИХ ГРАНУЛОЦИТІВ

(57) Реферат:

Спосіб визначення активності мієлопероксидази нейтрофільних гранулоцитів 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 солянокислого бензидину з перекисом водню, інкубують протягом 600 с. Вимірюють оптичну щільність контрольного та дослідного зразків на імуноферментному аналізаторі та визначають активність мієлопероксидази за формулою:

$$A = \Delta E / V \times t \times \varepsilon,$$

де A - активність мієлопероксидази, мккат/л;

ΔE - різниця оптичних щільностей контрольного та дослідного зразків;

V - об'єм проби, що вноситься, л;

t - час інкубації, с;

ε - коефіцієнт молярної екстинції бензидину, ммоль⁻¹ см⁻¹.

UA 102130 U

Корисна модель належить до медицини, а саме до способів аналізу крові, і може бути використана у лабораторній діагностиці. Визначення активності мієлопероксидази нейтрофільних гранулоцитів дає можливість прогнозувати розвиток захворювань, уточнити діагноз і своєчасно вжити заходи, спрямовані на регулювання активності цього ферменту, а також провести моніторинг мієлопероксидази під час клінічних випробувань фармакологічних препаратів.

Відомий спосіб визначення мієлопероксидази (МПО) в лейкоцитах крові (Справочник "Лабораторные методы исследования в клинике" под ред. проф. В.В. Меньшикова. – Москва. - "Медицина". - 1987 г.), за яким мазки крові висушують, фіксують в парах формаліну та інкубують з бензидиновим реактивом протягом 15 хв., 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, викликана складністю, багатостадійністю способу та суб'єктивністю обліку результатів за рахунок підрахування на мікроскопі, що значно знижує об'єктивність показника та потребує багато часу для виконання методики.

Відомий спосіб визначення мієлопероксидази в плазмі крові людини (Горудко И.В., Черкалина О.С., Соколов А.В., Пулина М.О., Захарова Е.Т., Васильев В.Б., Черенкевич С.Н., Панасенко О.М. – 2009. - Новые подходы к определению концентрации и пероксидазной активности миелопероксидазы в плазме крови человека. Биоорганическая химия. - Т. 35. - № 5 - С. 629-639) спектрофотометричним методом, за яким до плазми людини як субстрат додається о-діанізидин та після інкубації вимірюється оптична щільність на імуноферментному аналізаторі.

Недоліком такого способу є те, що визначення мієлопероксидази в плазмі людини, по-перше, не достатньо відображає функціональну активність нейтрофільних гранулоцитів, по-друге, в плазмі багато інших факторів, зокрема гемоглобін та церулоплазмін, що також мають пероксидазну активність, по-третє, в крові людини є механізми, що регулюють активність мієлопероксидази.

Відомий спосіб визначення пероксидазної активності мієлопероксидази в плазмі крові (ВУ13675, МПК G01N33/48, дата публікації 2010.10.30), що включає внесення о-діанізидину як субстрату у розбавлену буферним розчином плазму крові, спектрофотометричне визначення швидкості його окислення після додавання пероксиду водню і визначення активності мієлопероксидази, при цьому як буферний розчин використовують фосфат-цитратний буфер з рН 4,5, пероксид водню додають до концентрації 100-200 мкМ, спектрофотометричне визначення швидкості окислення субстрату здійснюють при відсутності і у присутності інгібітора мієлопероксидази - гідразиду 4-амінобензойної кислоти, активність мієлопероксидази визначають по різниці швидкостей окислення о-діанізидину за відсутності і у присутності гідразиду 4-амінобензойної кислоти.

Як і у попередньому аналізі недоліком такого способу є те, що визначення мієлопероксидази в плазмі людини недостатньо відображає функціональну активність нейтрофільних гранулоцитів, внаслідок того, що в плазмі багато інших факторів, зокрема гемоглобін та церулоплазмін, що також мають пероксидазну активність, крім того, в крові людини є механізми, що регулюють активність мієлопероксидази. Зазначені проблеми обумовлюють некоректну оцінку результатів дослідження активності мієлопероксидази нейтрофільних гранулоцитів пацієнта. Крім цього, таку методику характеризує висока трудомісткість способу дослідження, викликана складністю та багатостадійністю дій способу, що також потребує багато часу для виконання методики.

В основу корисної моделі поставлена задача створення способу визначення активності мієлопероксидази в нейтрофільних гранулоцитах, в якому за рахунок застосування нових дій по обробці досліджуваного зразка, нових речовин та вилучення факторів, що також мають пероксидазну активність, забезпечується підвищення чутливості і селективності процесу аналізу та достовірності оцінки активності мієлопероксидази.

Для вирішення поставленої задачі спосіб визначення активності мієлопероксидази нейтрофільних гранулоцитів включає інструментальні дослідження чистої популяції клітин, фотометричну детекцію характеристик зразка та оцінку діагностичних критеріїв.

Новим у способі є те, що виділяють із досліджуваного зразка крові чисту популяцію нейтрофільних гранулоцитів, додають у зразок з цими клітинами розчин солянокислого бензидину з перекисом водню, інкубують протягом 600 секунд, вимірюють оптичну щільність досліджуваних проб на імуноферментному аналізаторі, визначають різницю оптичних щільностей контрольного та дослідного зразків та визначають активність мієлопероксидази за формулою:

$$A = \Delta E / V \times t \times \epsilon,$$

де А - активність мієлопероксидази, мккат/л;

ΔE - різниця оптичних щільностей контрольного та дослідного зразків;

V - об'єм проби, що вноситься, л;

t - час інкубації, с;

ϵ - коефіцієнт молярної екстинції бензидину, ммоль⁻¹ см⁻¹.

Внаслідок застосування у аналізі нових дій та нових речовин підвищується достовірність оцінки активності мієлопероксидази нейтрофільних гранулоцитів за рахунок використання чистої популяції нейтрофільних гранулоцитів, забезпечення стійкого забарвлення, об'єктивної оцінки його інтенсивності на імуноферментному аналізаторі та зменшення впливу на забарвлення другорядних факторів.

При здійсненні способу у прикладі застосовувалась центрифуга LMC-4200R (Biosan, Латвія), 0,1 % розчин бензидину дигідрохлориду, спирт, 3 % розчин перекису водню, 0,1N HCl, та імуноферментний аналізатор iLEMS Labssystem (Фінляндія).

При проведенні дослідження у прикладах з периферійної крові виділяли клітини нейтрофільних гранулоцитів центрифугуванням на подвійному градієнті щільності (1.076 та 1.120), осаджували в полістиролових планшетах в концентрації 1×10⁶/л, надлишок зливали, потім у отриманий зразок з клітинами нейтрофільних гранулоцитів додавали 0,2 мл робочого розчину бензидину дигідрохлориду (5 мг бензидину розведені в 3 мл спирту та 2 мл дистильованої води, та 10 мкл 3 % перекису водню), через 10 хв. зупиняли реакцію 0,1N HCl та вимірювали інтенсивність забарвлення на імуноферментному аналізаторі.

Активність мієлопероксидази визначали за формулою:

$$A = \Delta E / V \times t \times \epsilon,$$

де А - активність мієлопероксидази, мккат/л;

ΔE - різниця оптичних щільностей контрольного та дослідного зразків;

V - об'єм проби, що вноситься (0,0002 л);

t - час інкубації (600 с);

ϵ - коефіцієнт молярної екстинції бензидину (6,95×10⁴ ммоль⁻¹ см⁻¹).

Спосіб пояснюється прикладами його застосування.

Приклад 1. Пацієнт М., 45 р. Було проведено дослідження та визначено активність мієлопероксидази у нейтрофільних гранулоцитах. Активність мієлопероксидази склала 61,3 мккат/л. Тобто показники нормальні. Висновок - людина здорова.

Приклад 2. Хворий Б., 46 р. Було проведено дослідження та визначено активність та вміст мієлопероксидази у нейтрофільних гранулоцитах. Активність мієлопероксидази склала 34,4 мккат/л. Тобто активність мієлопероксидази низька. Діагноз - гострий інфаркт міокарда.

Приклад 3. Хворий Л., 25 р. Було проведено дослідження та визначено активність та вміст мієлопероксидази у нейтрофільних гранулоцитах. Активність мієлопероксидази склала 149,0 мккат/л. Тобто активність мієлопероксидази висока. Діагноз - гострий ендокардит.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб визначення активності мієлопероксидази нейтрофільних гранулоцитів, 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 солянокислого бензидину з перекисом водню, інкубують протягом 600 секунд, вимірюють оптичну щільність контрольного та дослідного зразків на імуноферментному аналізаторі та визначають активність мієлопероксидази за формулою:

$$A = \Delta E / V \times t \times \epsilon,$$

де А - активність мієлопероксидази, мккат/л;

ΔE - різниця оптичних щільностей контрольного та дослідного зразків;

V - об'єм проби, що вноситься, л;

t - час інкубації, с;

ϵ - коефіцієнт молярної екстинції бензидину, ммоль⁻¹ см⁻¹.

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

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