



УКРАЇНА

(19) UA (11) 42092 (13) U
(51) МПК (2009)
G01N 33/50МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ СТАНУ АКТИВНОСТІ МІЕЛОПЕРОКСИДАЗИ НЕЙТРОФІЛІВ

1

2

(21) u200815274

(22) 30.12.2008

(24) 25.06.2009

(46) 25.06.2009, Бюл.№ 12, 2009 р.

(72) ОМЕЛЯНЧИК ЛЮДМИЛА ОЛЕКСАНДРІВНА,
КОЛІСНИК НАДІЯ ВАСИЛІВНА, САМОЙЛЕНКО
ЖАННА СЕРГІЙВНА, ЯЛОВЕНКО АЛІНА СЕРГІЙВ-
НА, НОВОСАД НАТАЛІЯ ВАСИЛІВНА(73) ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД
"ЗАПОРІЗЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ"
МІНІСТЕРСТВА ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ(57) Спосіб визначення стану активності мієлопе-
роксидази нейтрофілів, що включає реєстрацію
дати дослідження, забір капілярної крові, приготу-
вання мазка, фіксацію його формаліново-
спиртовим розчином, промивання в проточній воді,
висушування на повітрі, інкубацію в свіжопрігото-
ваному спиртово-водному розчині бензидину з
перекисом водню, промивання дистильованою
водою, висушування, дофарбовування мазка фа-
рбником Романовського-Гімзи і його мікроскопу-

вання, оцінювання активності мієлопероксидази за
кількістю жовтувато-коричневих гранул у цитопла-
змі 100 нейтрофілів за допомогою світлового мік-
роскопа, порівняння даних пацієнта з показником
мієлопероксидази в популяції, який **відрізняється**
тим, що додатково визначають відносну активність
мієлопероксидази за формулою:

$$\text{МПО}_{\text{н.відн.}} = \frac{\text{МПО}_{\text{н}}}{190,5 + 9,53x} \times 100, (1)$$

де

МПО_{н.відн.} - відносна активність МПО_н в обстежу-
ваної особи, %;МПО_н - активність МПО_н в обстежуваної особи,
у.о.;190,5 - постійний коефіцієнт значення мієлоперок-
сидази в популяції протягом року, у.о.;

9,53 - постійний коефіцієнт сезону року;

х - сезон року: 1 - зима, 2 - весна, 3 - літо, 4 - осінь,
за значенням якої роблять висновок про стан ак-
тивності мієлопероксидази в обстежуваної особи.

Спосіб відноситься до галузі медицини, а саме
лабораторної діагностики. Може бути використа-
ний у гематології, імунології, терапії, хірургії, аку-
шерстві, гінекології та ін.

Відомий спосіб визначення активності мієло-
пероксидази нейтрофілів (МПО_н) за Грехемом -
Кнолем [Пероксидаза (миєлопероксидаза) (К.Ф.
1.11.1.7). Метод Грэхема-Кнолля

<http://www.primer.ru/manuals/cytology/cytochem.htm>]
, який включає забір капілярної крові, приготуван-
ня мазка, фіксацію його 4% формаліново-
спиртовим розчином протягом 30±1с, промивання
в проточній воді, висушування на повітрі, інкубацію
протягом 5-10хв. у свіжопріготованому розчині
для виявлення активності мієлопероксидази, який
містить 2-3мг бензидину в 6мл 96% спирту, 4мл
води і 0,02мл 3% перекису водню, промивання
дистильованою водою, висушування, дофарбову-
вання мазка фарбником Романовського - Гімзи,
оцінювання активності мієлопероксидази за допо-
могою світлового мікроскопа в 100 нейтрофілах в
умовних одиницях за Астальді - Верга. Для чого,
залежно від кількості забарвлених гранул у цито-

плазмі, досліджувані нейтрофіли розподіляють на
4 групи: з негативною реакцією (-), слабкопозитив-
ною (+), позитивною (++) і різко позитивною (+++);
далі число нейтрофілів з однаковою інтенсивністю
забарвлення помножують на відповідне даній групі
число плюсів, сума цих добутків складає умовні
одиниці (у.о.); отримані дані порівнюють з даними,
що визначені у практично здорової людини (у кон-
тролі), і за цим показником роблять висновок про
стан активності мієлопероксидази нейтрофілів у
пацієнта.

Недоліком даного способу є неврахування по-
казника активності МПО_н, яке відображує актив-
ність ферменту в різні пори року, що обумовлює
некоректну оцінку результатів дослідження актив-
ності ферменту пацієнта.

Ознаками, спільними з рішенням, що заявля-
ється, є:

- забір капілярної крові;
- приготування мазка;
- фіксація його 4% формаліново-спиртовим
розчином протягом 30±1 с;
- промивання в проточній воді;

(13) U

(11) 42092

(19) UA

- висушування на повітрі;
- інкубація протягом 5-10хв. у свіжоприготованому розчині для виявлення активності мієлопероксидази, який містить 2-3мг бензидину в 6мл 96% спирту, 4мл води і 0,02мл 3% перекисів водню);

- промивання дистильованою водою;
- висушування;
- дофарбовування мазка фарбником Романовського - Гімзи;

- визначення активності мієлопероксидази за допомогою світлового мікроскопа в 100 нейтрофілах в умовних одиницях за Астальді - Верга. Для чого, залежно від кількості забарвлених гранул у цитоплазмі, досліджувані нейтрофіли розподіляють на 4 групи: з негативною реакцією (-), слабо-позитивною (+), позитивною (++) і різко позитивною (+++); далі число нейтрофілів з однаковою інтенсивністю забарвлення помножують на відповідне даній групі число плюсів, сума цих добутків складає умовні одиниці (у.о.);

- порівняння отриманих даних з даними, що визначені у практично здорової людини (у контролі) і визначення за цим показником стану активності мієлопероксидази.

Відомий спосіб оцінки активності МПОн за параметрами її річного біоритму [Н.В. Колесник, Н.Г. Бараник, Ю.А. Кривохацька, Г.Б. Стерн, Н.Б. Широколова. Параметры годовых ритмов активности ферментов лейкоцитов практически здоровых лиц // Тезисы докладов научно-практической конференции врачей г. Запорожье, посвященной памяти выдающихся медиков-рационализаторов В.В. Ярошенко и Я.Р. Гасуля. Запорожье- 1994. - 156 с. - С. 95-97], спосіб включає:

- реєстрацію місяця дослідження;
- забір капілярної крові між 9-10 годинами;
- виготовлення мазка;
- фіксація його 4% формаліново-спиртовим розчином протягом 30с;

- промивання в проточній воді;
- висушування на повітрі;
- інкубація протягом 5-10хв. у свіжоприготованому розчині для виявлення активності мієлопероксидази, який містить 2-3мг бензидину на кінчику скальпеля в 6мл 96% спирту, 4мл води і 0,02мл 3% перекису водню;

- промивання дистильованою водою;
- висушування;
- дофарбовування мазка фарбником Романовського - Гімзи;

- оцінювання активності мієлопероксидази за жовтуватого-коричневими гранулами в цитоплазмі 100 нейтрофілів в умовних одиницях за Астальді - Верга за допомогою світлового мікроскопа. Для чого, залежно від кількості забарвлених гранул у цитоплазмі, досліджувані нейтрофіли розподіляють на 4 групи: з негативною реакцією (-), слабо-позитивною (+), позитивною (++) і різко позитивною (+++); далі число нейтрофілів з однаковою інтенсивністю забарвлення помножують на відповідне даній групі число плюсів, сума цих добутків складає умовні одиниці (у.о.);

- порівняння значення активності МПОн пацієнта зі середньорічним значенням цього показника в популяції, який приймають за норму, а амплітуду річного коливання - за верхню і нижню межі норми

і визначення за цим показником стану активності мієлопероксидази нейтрофілів.

Недоліком даного способу є неможливість порівняння активності МПОн досліджуваного зразка крові з такою, яка відповідає сезону дослідження, що обумовлює некоректну оцінку результатів дослідження.

Спільними з прототипом ознаками є:

- реєстрація місяця дослідження;
- забір капілярної крові між 9 і 10 годинами;
- виготовлення мазка;
- фіксація його 4% формаліново-спиртовим розчином протягом 30±с;

- промивання в проточній воді;
- висушування на повітрі;
- інкубація протягом 5-10хв у свіжоприготованому розчині для виявлення активності мієлопероксидази, який містить 2-3мг бензидину в 6мл 96% спирту, 4мл води і 0,02мл 3% перекису водню;

- промивання дистильованою водою;
- висушування;
- дофарбовування мазка фарбником Романовського - Гімзи;

- оцінювання активності мієлопероксидази за допомогою світлового мікроскопа в 100 нейтрофілах в умовних одиницях за Астальді - Верга. Для чого, залежно від кількості забарвлених гранул у цитоплазмі, досліджувані нейтрофіли розподіляють на 4 групи: з негативною реакцією (-), слабо-позитивною (+), позитивною (++) і різко позитивною (+++); далі число нейтрофілів з однаковою інтенсивністю забарвлення помножують на відповідне даній групі число плюсів, сума цих добутків складає умовні одиниці (у.о.);

- порівняння отриманих даних з даними у контролі і визначення за цим показником стану активності мієлопероксидази нейтрофілів у пацієнта.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб визначення стану активності мієлопероксидази нейтрофілів шляхом визначення активності ферменту в нейтрофілах мазків крові з використанням цитохімічної реакції зі врахуванням залежності активності ферменту від сезону року, який дозволяє здійснити експрес-оцінку активності МПОн у досліджуваній особі, підвищити її точність і коректність.

Суттєвими ознаками способу є:

- реєстрація дати дослідження;
- забір капілярної крові;
- виготовлення мазка;
- фіксація його 4% формаліново-спиртовим розчином протягом 30±1с;

- промивання в проточній воді;
- висушування на повітрі;
- інкубація протягом 5хв у свіжоприготованому розчині для виявлення активності мієлопероксидази, який містить 2-3мг бензидину в 6мл 96% спирту, 4мл води і 0,02мл 3% перекису водню;

- промивання дистильованою водою;
- висушування;
- дофарбовування мазка фарбником Романовського - Гімзи;

- мікроскопування;
- визначення активності ферменту за наявністю жовтуватого-коричневих гранул у цитоплазмі клітин;

- визначення активності мієлопероксидази за допомогою світлового мікроскопа в 100 нейтрофілах в умовних одиницях за Астальді - Верга. Для чого, залежно від кількості забарвлених гранул у цитоплазмі, досліджувані нейтрофіли розподіляють на 4 групи: з негативною реакцією (-), слабкопозитивною (+), позитивною (++) і різко позитивною (+++); далі число нейтрофілів з однаковою інтенсивністю забарвлення помножують на відповідне даній групі число плюсів, сума цих добутків складає умовні одиниці (у.о.).

- розрахунок відносної активності МПОН у досліджуваної особи за формулою:

$$\text{МПОН}_{\text{відн.}} = \frac{\text{МПОН}_{\text{н}}}{190,5 + 9,53x} \times 100, \quad (1)$$

де

- $\text{МПОН}_{\text{відн.}}$ - відносна активність МПОН в обстежуваної особи, %;

- $\text{МПОН}_{\text{н}}$ - активність МПОН в обстежуваної особи, у.о.;

- 190,5 - постійний коефіцієнт значення мієлопероксидази в популяції протягом року;

- 9,53 - постійний коефіцієнт впливу сезону року на активність МПОН;

- x - сезон року: 1 - зима, 2 - весна, 3 - літо, 4 - осінь;

- визначення за цим показником стану активності мієлопероксидази нейтрофілів у пацієнта.

Відмінними від прототипу ознаками є визначення відносної активності мієлопероксидази нейтрофілів за формулою 1 шляхом порівняння результатів активності ферменту МПОН пацієнта зі значеннями активності ферменту в популяції в конкретний сезон року та оцінка за цим показником стану активності мієлопероксидази нейтрофілів у пацієнта.

Спосіб обґрунтовано щомісячними дослідженнями протягом трьох років (394 особи) активності ферменту в мазках периферичної крові позаштатних донорів з діагнозом «здоровий» і відсутністю змін у лейкоцитарній формулі. Досліджували кров, яку відбирали між 9-10 годинами ранку, готували мазки, фіксували їх 4% формаліново-спиртовим розчином протягом 30 ± 1 с, промивали в проточній воді, висушували на повітрі, інкубували протягом 5-10хв. у свіжоприготованому розчині для виявлення активності мієлопероксидази, який містить 2-3мг бензидину в 6мл 96% спирту, 4мл води і 0,02мл 3% перекису водню, промивали дистильованою водою, висушували, дофарбовували мазки фарбником Романовського - Гімзи, оцінювали активність мієлопероксидази за допомогою світлового мікроскопа за жовтувато-коричневими гранулами в цитоплазмі 100 нейтрофілів в умовних одиницях за Астальді - Верга. Для чого, залежно від кількості забарвлених гранул у цитоплазмі, досліджувані нейтрофіли розподіляють на 4 групи: з негативною реакцією (-), слабкопозитивною (+), позитивною (++) і різко позитивною (+++); далі число нейтрофілів з однаковою інтенсивністю забарвлення помножують на відповідне даній групі число плюсів, сума цих добутків складає умовні одиниці (у.о.); розраховували відносну активність МПОН у досліджуваної особи за формулою 1 і ви-

значення за цим показником стану активності мієлопероксидази нейтрофілів у пацієнта.

Статистичний аналіз отриманої бази даних здійснювали за допомогою ППП SPSS, модулів «Регресія»- метод зважених найменших квадратів, «Факторний аналіз», «Часові ряди» і «Графічний аналіз». Активність ферменту в практично здорових осіб не залежить від віку і статі. На основі статистичного аналізу бази даних було встановлено залежність активності мієлопероксидази від сезону року, що відображується рівнянням:

$$\text{МПОН}_c = 190,50 + 9,53x, \quad (2)$$

де

- МПОН_c - активність мієлопероксидази нейтрофілів, що відповідає конкретному сезону року, у.о.;

- 190,50 - постійний коефіцієнт активності мієлопероксидази в популяції протягом року, у.о.;

- 9,53 - постійний коефіцієнт впливу сезону року на активність МПОН;

- x - сезон року (1 - зима, 2 - весна, 3 - літо, 4 - осінь);

- 95% довірчий інтервал дорівнює $\pm 10\%$.

Спосіб здійснюють таким чином: реєструють дату дослідження; проводять забір капілярної крові; готують мазок; фіксують його 4% формаліново-спиртовим розчином протягом 30 ± 1 с; промивають у проточній воді; висушують на повітрі; інкубують протягом 5-10хв у свіжоприготованому розчині для виявлення активності мієлопероксидази, який містить 2-3мг бензидину в 6мл 96% спирту, 4мл води і 0,02мл 3% перекису водню; промивають дистильованою водою; висушують; дофарбовують мазок фарбником Романовського - Гімзи; оцінюють активність мієлопероксидази за допомогою світлового мікроскопа за жовтувато-коричневими гранулами в цитоплазмі 100 нейтрофілів в умовних одиницях за Астальді - Верга. Для чого, залежно від кількості забарвлених гранул у цитоплазмі, досліджувані нейтрофіли розподіляють на 4 групи: з негативною реакцією (-), слабкопозитивною (+), позитивною (++) і різко позитивною (+++); далі число нейтрофілів з однаковою інтенсивністю забарвлення помножують на відповідне даній групі число плюсів, сума цих добутків складає умовні одиниці (у.о.); отримані дані порівнюють з даними, що визначені у практично здорової людини (у контролі), визначають відносну активність $\text{МПОН}_{\text{відн.}}$ за формулою 1; за цим показником роблять висновок про стан активності мієлопероксидази пацієнта і при значенні показника в діапазоні 100 ± 15 діагностують популяційну норму.

Приклад конкретного виконання.

Пацієнтка К., вік 29 років. Діагноз - вагітність 31 тиждень, загроза переривання вагітності.

Дата дослідження активності МПОН - 19 лютого 2008 року; проводили забір капілярної крові; готували мазок; фіксували його 4% формаліново-спиртовим розчином протягом 30с; промивали в проточній воді; висушували на повітрі; інкубували 5хв у свіжоприготованому розчині для виявлення активності мієлопероксидази, який містив 2-3мг бензидину в 6мл 96% спирту, 4мл води і 0,02мл 3% перекису водню; промивали дистильованою водою; висушували; дофарбовували мазок фарбником Романовського - Гімзи; оцінювали актив-

ність мієлопероксидази за допомогою світлового мікроскопа в 100 нейтрофілах за жовтувато-коричневими гранулами в цитоплазмі клітин. Для чого, залежно від кількості забарвлених гранул у цитоплазмі, досліджувані нейтрофіли розподіляли на 4 групи: з негативною реакцією (-), слабкопозитивною (+), позитивною (++) і різко позитивною (+++); далі число нейтрофілів з однаковою інтенсивністю забарвлення помножували на відповідне даній групі число плюсів, сума цих добутків складала умовні одиниці (у.о.);

Активність ферменту в пацієнтки складала 237 у.о. Розраховували відносну активність МПОН_{відн.} у пацієнтки за формулою 1,

$$\text{МПОН}_{\text{відн.}} = \frac{237}{190,5 + 9,53 \times 1} \times 100 = 118,78\%$$

Таким чином, при загрозі переривання вагітності на 31 тижні, активність МПОН у пацієнтки практично відповідала сезонній нормі в популяції.

Пацієнт Т., вік - 23 роки. Діагноз - загострення лівобічного хронічного мезотімпаніту.

Дата дослідження -12 грудня 2007 року; проводили забір капілярної крові; готували мазок; фіксували його 4% формаліново-спиртовим розчином протягом 30с; промивали в проточній воді; висушували на повітрі; інкубували 5хв у свіжоприготованому розчині для виявлення активності мієлопероксидази, який містив 2-3мг бензидину в 6мл 96% спирту, 4мл води і 0,02мл 3% перекису водню; промивали дистильованою водою; висушували;

дофарбовували мазок фарбником Романовського - Гімзи; оцінювали активність мієлопероксидази за допомогою світлового мікроскопа в 100 нейтрофілах за жовтувато-коричневими гранулами в цитоплазмі клітин. Для чого, залежно від кількості забарвлених гранул у цитоплазмі, досліджувані нейтрофіли розподіляли на 4 групи: з негативною реакцією (-), слабкопозитивною (+), позитивною (++) і різко позитивною (+++); далі число нейтрофілів з однаковою інтенсивністю забарвлення помножували на відповідне даній групі число плюсів, сума цих добутків складала умовні одиниці (у.о.).

Активність ферменту складала 166 у.о. Розраховували відносну активність МПОН_{відн.} у пацієнта за формулою:

$$\text{МПОН}_{\text{відн.}} = \frac{166}{190,5 + 9,53 \times 4} \times 100 = 72,6\%$$

Отже, загострення хронічного мезотімпаніту перебігало на фоні незначного зниження активності МПОН, що може бути підставою лікареві призначити хворому препарати з антиоксидантною дією.

Таким чином, запропонований спосіб дозволяє проводити експрес-оцінку стану метаболічної активності нейтрофілів пацієнта з урахуванням стану активності мієлопероксидази в популяції, яка відповідає сезону дослідження, що забезпечує коректне оцінювання результатів аналізу та обумовлює призначення адекватної терапії.