



УКРАЇНА

(19) UA (11) 57646 (13) U
(51) МПК (2011.01)
G01N 21/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ ІНТЕНСИФІКАЦІЇ ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ ПРИ РЕВМАТОЇДНОМУ АРТРИТІ

1

(21) u201009085

(22) 19.07.2010

(24) 10.03.2011

(46) 10.03.2011, Бюл.№ 5, 2011 р.

(72) РЕКАЛОВ ДМИТРО ГЕННАДІЙОВИЧ

(73) ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ, РЕКАЛОВ ДМИТРО ГЕННАДІЙО-
ВИЧ

(57) Спосіб оцінки інтенсифікації вільнорадикальних процесів у хворих на ревматоїдний артрит шляхом проведення лабораторного біохімічного дослідження венозної крові, який **відрізняється** тим, що проводять визначення рівня утворення альдегідних і кетонних похідних фенілгідрозону (продуктів окисної модифікації білків крові) у результаті ланцюга реакцій між двовалентними залі-

2

зом, амінокислотними залишками і перекисом водню з подальшим дезамінуванням і синтезом зазначених форм карбонільної модифікації протеїнів крові за реакцією взаємодії окислених амінокислотних залишків білків з 2,4-динітрофенілгідразом з утворенням 2,4-динітрофенілгідрозонів, які реєструють спектрофотометрично за визначенням інтенсивності світлопоглинання їх при довжині хвиль 270нм (для альдегідфенілгідрозонів) та 363нм (для кетонфенілгідрозонів) (реактив Фентона), та діагностують інтенсифікацію вільнорадикальних процесів при РА при рівні альдегідних та кетонних форм фенілгідрозонів після каталізування з іонами заліза більш ніж 0,15 та 0,2 умов, од/г білка, відповідно.

Корисна модель стосується медицини, а саме ревматології і може бути використана для оцінки інтенсифікації вільно-радикальних процесів у хворих на ревматоїдний артрит (РА).

Протягом останніх років була висунута концепція про істотну патогенетичну роль оксидантного стресу у пошкодженні клітин, обумовлених імунним запаленням. Поряд з цим, особлива увага приділяється питанням патогенетичної ролі активних форм кисню і ініційованих ними процесів перекисного окислення ліпідів у розвитку та прогресуванні запально-деструктивних процесів у хворих на РА. Окислювальний стрес розглядається одним з важливих факторів при цьому захворюванні: постійна генерація активних форм кисню в суглобах хворих активованими нейтрофілами і макрофагами, а також за рахунок циклічно повторюваних процесів гіпоксії-реперфузії при роботі суглобів, призводить до пошкодження синовіальних клітин, руйнування хряща і ерозії кісткової тканини. Більш того, показано, що низький антиоксидантний статус клітин і тканин організму є можливим фактором ризику для даного захворювання. Вільні кисневі радикали, генеровані моноцитами, поліморфно-ядерними нейтрофілами, синовіальними макрофагами, та високотоксичні продукти

ліпопероксидації накопичуються у біологічних середовищах організму і, в умовах недостатності ендогенної антиоксидантної системи, викликають деполімерізацію матриксу сполучної тканини як безпосередньо, так і шляхом активації протеолітичних ферментів, матриксних металопротеїназ; порушують синтетичні процеси в фібробластах і хондроцитів, викликають розвиток субхондральної ерозії; активують лейкоцитарну колагеназу; сприяють розвитку апоптозу і некрозу міоцитів, ендотеліальних клітин, хондроцитів, що в свою чергу сприяє подальшому ускладненню імунних порушень та інтенсифікації запально-деструктивних процесів при РА. У роботах, присвячених проблемі зміни активності оксидативного стресу при РА, зазвичай оцінюється рівень продуктів ліпопероксидації - малонового діальдегіду, дієнових кон'югатів. Усі згадані порушення можуть серйозно абс повністю дезорганізувати функціонування клітин і організму в цілому, погіршити стан хворого. Проте, крім ліпідів в рамках ліпопероксидації, у процес вільнорадикального окислення інтенсивно залучаються і інші класи органічних речовин. Особливе значення серед них мають білки. Окислювальна модифікація білкових молекул вносить істотний внесок в механізм вільнорадикального пошко-

(19) UA (11) 57646 (13) U

дження клітин. Більш того, в літературі зустрічаються вказівки про більшу чутливість саме білків до окисдації, ніж ліпідів. З огляду на це, представляється досить актуальним розширення існуючих уявлень про патогенетичну роль прооксидантних процесів в механізмах пошкодження хрящової тканини при РА за даними саме оцінки окисної модифікації протеїнів та особливостям накопичення карбонілірованих білків в умовах запалення суглобів та імунної деструкції хрящу.

Найбільш близьким за технічною сутністю та результатом, що досягається, є відомий спосіб оцінки інтенсифікації вільно-радикальних процесів при РА, відомий як оцінка інтенсивності хемілюмінесценції крові у хворих на РА [Тартаковский И.А., Шерстнев М.П., Пирязев А.П., Шайков А.В. Клиническая оценка хемилуминесценции цельной крови при ювенильном ревматоидном артрите //Ревматология. - 1989. - №4. - С.39-42]:

1. У хворих на РА отримують кров шляхом венепункциї стандартним способом.

2. Додають до крові необхідну кількість кристалів сульфату барію.

3. Вимірюють хемілюмінесценцію крові на хемілюмінометрі оснащеному фотоелектронним помножувачем ФЕП-17.

4. Оцінюють інтенсивність хемілюмінесценції крові, як світлосуму випромінювання за одиницю часу, за допомогою стандартного радіолюмінесцентного лічильника.

5. Інтерпретація даних - при перевищенні показника спонтанної хемілюмінесценції крові більш ніж 1,25 умов. од. роблять висновок щодо підвищення активності вільно-радикальних процесів при ювенільному РА.

Суттєвими ознаками найближчого аналогу і корисної моделі, що збігаються, є такі:

- проведення лабораторного біохімічного дослідження венозної крові.

Не зменшуючи значення вказаного способу для оцінки інтенсифікації вільнорадикальних процесів при РА, слід зазначити, що указаний спосіб оцінки метаболізму вільних радикалів у хворих на РА за допомогою визначення хемілюмінесценції крові дає лише уяву про загальний стан вільнорадикальних процесів в організмі. Однак, при використанні цього способу оцінки метаболізму вільних радикалів, автори застосовують індукцію хемілюмінесценції зразка крові за допомогою кристалів сульфату барію. Даний підхід дозволяє у кілька разів посилити сигнал хемілюмінесценції, але разом з тим приводить до збільшення кількості перешкод, що негативно позначається на точності вимірювання. До того ж на точність і достовірність аналізу негативно впливає застосування радіолюмінесцентного еталонного джерела випромінювання, який з часом зменшує інтенсивність випромінювання, а також використання фотоелектронного помножувача. Справа в тому, що фотоелектронні помножувачі із різних хемілюмінометрів мають дещо відмінні фізичні властивості, що заважає порівнювати данні хемілюмінесценції отримані різними дослідниками. Також слід вказати, що даним способом не аналізується такий важливий параметр хемілюмінесценції, як невеликі по інтен-

сивності, але значні по кількості низько інтенсивні спалахи кривої спонтанної хемілюмінесценції, що негативно впливає на точність і достовірність оцінки метаболізму вільних радикалів у хворих на РА. Більш того, в літературі зустрічаються вказівки про більшу чутливість білків до вільнорадикального окислення, ніж ліпідів.

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалення способу оцінки інтенсифікації вільнорадикальних процесів при РА шляхом комплексного дослідження окислювальної модифікації білків у хворих на РА, а саме визначення рівня метал-каталізуемого окислення білків шляхом оцінки процесів окислення білків сироватки крові у присутності системи донаторів електронів і металу змінної валентності, що, у комплексі, забезпечить простоту, статистичне підвищення вірогідності, точності і достовірності в оцінці інтенсифікації вільно-радикальних процесів при РА.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі, який включає проведення лабораторного біохімічного дослідження венозної крові, новим є те, що проводять визначення рівня утворення альдегідних і кетонних похідних фенілгідразону (продуктів окисної модифікації білків крові) у результаті ланцюга реакцій між двовалентних залізом, амінокислотними залишками і перекисом водню з подальшим дезамінуванням і синтезом зазначених форм карбонільної модифікації протеїнів крові за реакцією взаємодії окислених амінокислотних залишків білків з 2,4-дінітрофенілгідразіном з утворенням 2,4-дінітрофенілгідразонів, які реєструють спектрофотометрично за визначенням інтенсивності світлопоглинання їх при довжині хвиль 270нм (для альдегідфенілгідразонів) та 363нм (для кетонфенілгідразонів) (реактив Фентона), та діагностують інтенсифікацію вільно-радикальних процесів при РА при рівні альдегідних та кетонних форм фенілгідразонів після каталізування з іонами заліза більш ніж 0,15 та 0,2 умов, од/г білку, відповідно.

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю ознак, що заявляються, та технічним результатом полягає у наступному: зазначений комплексний підхід щодо оцінки інтенсифікації вільнорадикальних процесів при РА на підставі визначення рівня метал-каталізуемого окислення білків шляхом ініціювання процесів окислення білків сироватки крові інкубуванням з розчинами солей двохвалентного заліза та перекисом водню дозволяє у повній мірі оцінити стан окислювально-відновного гомеостазу, визначити ступінь окисдантно-прооксидантного дисбалансу та встановити виразність порушень у антиокислювальному потенціалі сироватки крові в умовах запалення при РА. На підставі цих даних розроблений новий спосіб оцінки інтенсифікації вільно-радикальних процесів при РА дозволить адекватно і достовірно оцінити виразність цитотоксичності та метаболічних порушень при РА, які асоціюються з активацією вільнорадикального окислення, що дозволить своєчасно провести необхідні лікувальні заходи щодо корекції процесів протеїнопероксидації з індивідуальним призначенням імунокорегуючої антизапальної

терапії з антиоксидантними властивостями та запобігти появі патологічних змін в організмі хворих на РА, пов'язаних з прогресуванням оксидативного стресу. Оцінка сукупності вищезазначених біохімічних ознак, що характеризують маркерні продукти окислювальної модифікації білків, яка проведена уперше, дозволить підвищити ефективність оцінки інтенсифікації вільно-радикальних процесів при РА.

Для визначення показника референтних значень нами було обстежено 54 практично здорових особи віком від 36 до 62 років. Середній вік склав $43,09 \pm 1,16$ роки. Серед обстежених жінок було 30 (55,55%), чоловіків - 24 (44,45%). Після обчислення результатів обстеження цієї групи осіб, було встановлено, що рівень альдегідних та кетонних форм дінитрофенілгідразонів після металоіндукції склав відповідно $0,114 \pm 0,002$ ($0,055-0,2$) умов, од/г білку та $0,068 \pm 0,006$ ($0,021-0,15$) умов, од/г білку. Також визначили рівень продуктів металстимульованої окисної модифікації білку у 50 хворих з РА (середній вік $58,09 \pm 1,39$ роки, 29 чоловіків та 21 жінка). Досліджувані показники склали $0,328 \pm 0,006$ ($0,163-0,596$) умов, од/г білку та $0,242 \pm 0,007$ ($0,093-0,377$) умов, од/г білку, відповідно. Таким чином, враховуючи верхню межу 95 % довірчого інтервалу показників, можна визначити референтні показники норми, як 0,2 умов, од/г білку для альдегідних та форм дінитрофенілгідразонів та 0,15 умов, од/г білку для кетонних форм дінитрофенілгідразонів.

Спосіб заснований на реакції взаємодії окислених амінокислотних залишків з 2,4-дінитрофенілгідразіном з утворенням 2,4-дінитрофенілгідразонів. Для ініціації окисної модифікації білку використовують середу Фентона ($0,1\text{М}$ фосфатний буфер рН 7,4, 1мМ Fe^{2+} , $0,3\text{мМ}$ H_2O_2). Для визначення окисної модифікації білку проводять попереднє його осадження за допомогою 20% розчину трихлороцтової кислоти. Для роботи беруть зразки біологічних проб для металіндукованої реєстрації окисної модифікації білку. Необхідні реактиви: 2,8% розчин заліза (II) сульфату; 4% розчин перекису водню; 25% розчин трихлороцтової кислоти; 0,9% розчин натрію хлориду; 2,2% розчин 2,4-дінитрофенілгідразину, який виготовлено на 7% розчині соляної кислоти; етилацетат; 50 % розчин сечовини.

Спосіб здійснюють таким чином:

1. До 0,1мл сироватки додають 0,1мл 2,8% розчину заліза сульфату і 0,1мл 4% розчину перекису водню.
2. Інкують 2 години при температурі 37°C .
3. Додають 0,1мл 25% трихлороцтової кислоти.
4. Центрифугують 30 хвилин при 3000об/хв.
5. Додають до осаду 1мл 2,2% розчину 2,4-дінитрофенілгідразину на 2М HCl
6. Центрифугують при 3000об/хв.
7. Зливають надосадак.
8. Промивають осад 3мл розчином етилацетату.
9. Висушують осад стандартним способом.
10. Додають до осаду $3,0\text{мл}$ 8М сечовини і 1мл 2М соляної кислоти.

11. Проводять спектрофотометричне дослідження проб при довжині хвиль 270нм (аліфатичні альдегіди основних амінокислотних залишків) і 363нм (карбонільні групи основних амінокислотних залишків).

12. Здійснюють розрахунок ступеня окисної модифікації білку за формулою:

$$C = E / C_b$$

де E - екстинція; C_b - концентрація білку в пробі.

13. Діагностують інтенсифікацію вільно-радикальних процесів при РА при рівні альдегідних та кетонних форм фенілгідразонів після каталізування з іонами заліза більш ніж 0,15 та 0,2 умов, од/г білку, відповідно.

Приклад:

Хвора В. 1956 року народження госпіталізована у ревматологічне відділення КУ «Запорізька обласна клінічна лікарня» зі скаргами на слабкість, поганий сон, вранішню скованість у суглобах, болі у міжфалангових та п'яснофалангових суглобах обох кистей рук і стоп, у правому і лівому колінних суглобах з припухлістю цих суглобів. Вважає себе хворою близько 9 років, коли вперше з'явилась припухлість, біль у невеликих суглобах. Неодноразово знаходилась на стаціонарному лікуванні, де їй проводився курс традиційного консервативного лікування, що включало нестероїдні протизапальні та десенсибілізуючі препарати. Об'єктивно у хворої спостерігаються наступні зміни. Відмічається блідість шкіри, припухлість і дефігурація суглобів, контрактура правого і лівого колінних суглобів і п'ясно-фалангових суглобів обох кистей. При пальпації правого і лівого колінного суглоба відмічається болісність по лінії суглобової щілини, ознаки розхитаності внутрішньої та зовнішньої бокової зв'язки. Шкіра над колінними суглобами тепліше оточуючих тканин, в порожнині суглобів виявлено вільний випот. Незначна атрофія м'язів нижніх кінцівок. Рентгенологічно виявлені зміни, що відповідають II стадії РА: виражений навколосуглобний остеопороз, помірне звуження суглобних щілин, ознаки хрящової деструкції. Лабораторні показники вказують на низький вміст еритроцитів - $3,2 \times 10^{12}/\text{л}$, низьку концентрацію гемоглобіну - $103\text{г}/\text{л}$, високе значення ШОЕ - $51\text{мм}/\text{годину}$ і високий рівень С-реактивного білку - $46,67\text{мг}/\text{л}$. Враховуючи скарги хворої, клінічну картину захворювання і дані об'єктивного обстеження, хворій був поставлений діагноз: РА, серопозитивна форма, повільно прогресуючий перебіг, ступінь активності III, рентгенологічна стадія II, суглобова функціональна недостатність II ступеня. Враховуючи часту асоціацію РА з посиленням вільнорадикальних процесів та зменшенням протекторної дії антиоксидантної системи, а також з метою уточнення стану хворої та оптимізації протизапальної терапії, у хворої була проведена оцінка індукованої сульфатом барію хемілюмінесценції крові. Отриманні результати оцінки індукованої хемілюмінесценції крові даним способом, показали, що рівень спонтанної хемілюмінесценції склав $3,84$ умовних одиниць, що свідчило про невисокий рівень хемілюмінесценції, що був близьким до норми і відповідав неактивній фазі РА. Результати отримані даним

методом не відповідали клінічній картині захворювання та враховуючі часту асоціацію активності захворювання РА із інтенсифікацією вільно-радикальних процесів та з метою оптимізації хондропротекторної терапії, хворій було проведено визначення рівня метал-каталізуємого окислення білків шляхом ініціювання процесів окислення білків сироватку крові інкубуванням з розчинами солей двохвалентного заліза та перекисом водню, при цьому рівень альдегідних та кетонних форм дінітрофенілгідразонів після металоіндукції склав

відповідно 0,321 та 0,208 умов, од/г білку, що свідчило про наявність у хворої патологічної активації вільно-радикальних процесів. Таким чином, використання способу, що пропонується, дозволило вчасно діагностувати порушення окислювально-відновлювального гомеостазу у хворого з РА та призначити патогенетично обґрунтовану терапію з включенням антиоксидантів, що в підсумку призвело до підвищення якості діагностики та дозволило оптимізувати лікування і відвернути появу ускладнень.