



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **66050** (13) **U**
(51) МПК
G01N 33/48 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ЕКСПРЕС-ВИЗНАЧЕННЯ ЗАГАЛЬНОЇ АНТИОКСИДАНТНОЇ АКТИВНОСТІ ПЛАЗМИ ОЗОНОВАНОЇ КРОВІ ХВОРИХ

1

2

(21) u201105717

(22) 06.05.2011

(24) 26.12.2011

(46) 26.12.2011, Бюл.№ 24, 2011 р.

(72) КОЗИН ЮРІЙ ІВАНОВИЧ, ДЮБКО ТЕТЯНА
СТАНІСЛАВІВНА, СОКОЛИК ОКСАНА ОЛЕКСІЇВ-
НА, ЛЕБІДЬ ПЕТРО БОРИСОВИЧ, ЛУК'ЯНОВ
ІГОР ЕДУАРДОВИЧ, РОШАЛЬ ОЛЕКСАНДР ДА-
ВИДОВИЧ, КШИМІНСЬКИЙ КАРОЛ, PL

(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ЗАГАЛЬ-
НОЇ ТА НЕВІДКЛАДНОЇ ХІРУРГІЇ АКАДЕМІЇ МЕ-
ДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ"

(57) Спосіб експрес-визначення загальної антиок-
сидантної активності озонованої плазми крові хво-

рих, що включає оцінку інактивації вільних радика-
лів з використанням люмінесцентного агента, який
відрізняється тим, що як люмінесцентний агент
вибирають продукт взаємодії фенолового ефіру N-
метилакридинійкарбонової кислоти і пероксиду
водню в середовищі карбонатного буферного роз-
чину (рН 9,93), а загальну антиоксидантну актив-
ність плазми оцінюють за допомогою реєстрації
кінетики гасіння люмінесценції люмінесцентного
агента в розчині плазми крові в умовних одиницях
(с⁻¹мкл⁻¹) з формуванням кривих гасіння і обчис-
ленням по них питомої сталої швидкості гасіння
хемілюмінесценції ($K_{CL\text{пит}}$).

Корисна модель стосується медицини і може
бути використана для визначення загальної антиок-
сидантної активності плазми або сироватки крові
хворих перед початком і на різних етапах проце-
дур озонотерапії для оцінки їх ефективності і моні-
торингу процесу лікування.

Чисельними клінічними дослідженнями вста-
новлено, що активація процесів вільнорадикально-
го окислення є важливим патологічним фактором,
який негативно впливає на ефективність лікування
і прогноз захворювання. Одним з шляхів корекції
антиоксидантного статусу є озонотерапія [Козин
Ю. И. Развитие метода озонотерапии и возможно-
сти его применения в практике урологов и андро-
логов // Харківська хірургічна школа. - 2002. - №
4(5). - С. 112-116]. Озон, який є неспецифічним
індуктором антиоксидантного захисту організму,
який здійснюється за механізмом зворотного зв'яз-
ку. Наявність в організмі пацієнта розчиненого
озону і продуктів його окислення (пероксидів, озоні-
дів) до певного, граничного рівня, спричиняє ви-
ражений позитивний вплив на організм, який за-
лежить від виду і тяжкості перебігу патологічного
стану, а також від індивідуальній чутливості орга-
нізму і його здатності до відновлення антиоксидан-
тного захисту. В той же час, перевищення оптима-
льних концентрацій озону може спричинити по-
рушення структури компонентів крові і пригніч-
чення її антиоксидантної активності. Тому своєча-

сний, швидкий і динамічний моніторинг антиокси-
дантного статусу крові як перед початком проце-
дури, так і на різних її етапах є вкрай необхідним
для правильного вибирання необхідних доз озону,
методики й тривалості лікування та підвищення
його ефективності. При цьому, серед існуючих
методів визначення оксидантно-прооксидантного
статусу організму найбільш адекватними можна
вважати ті, які характеризують загальну антиокси-
дантну активність (ЗАА) плазми крові.

Зазвичай для визначення ЗАА біологічної рі-
дини використовують модельні системи, до складу
яких входять компоненти, які забезпечують гене-
рацію вільних радикалів і систему їх детекції. Вве-
дення в таку систему перехоплювача вільних ра-
дикалів або речовин, що впливають на
концентрацію чи кількість іонів-каталізаторів ви-
кличе зменшення концентрації вільних радикалів
чи каталізаторів, що вплине на параметри систе-
ми, яка детектується [Клебанов Г. И. Исследо-
вание антиоксидантных свойств Веторона // Веторон.
Применение в клинической и медицине. - М., 2000.
- С. 20-21].

Відомий спосіб визначення загальної антиок-
сидантної активності (ЗАА) плазми крові і ліквора
[див. Спектр Е. Б., Ананенко А. А., Политова Л. Н.
// Лаб. дело. - 1984. - 1. - С. 26-28]. Метод в поля-
гає індукції окислення рідини, яка досліджується,
УФ-світлом і наступній оцінці її ЗАА шляхом визна-

(19) **UA** (11) **66050** (13) **U**

чення її інгібуючого впливу на вільнорадикальне окислення мембран еритроцитів.

Недоліки: а) використання субстрату (мембрани еритроцитів), який складно отримувати - матеріал для модельної системи при кожному його приготуванні має різні початкові параметри; б) інкубація одноразова - 30 хвилин; в) оцінка продуктів перекисного окислення здійснюється тільки на довжині хвилі 532 нм; г) важко отримати тест-систему в стандартному вигляді, так як при її зберіганні початковий рівень продуктів ПОЛ і їх ЗАА постійно змінюються.

Існує спосіб "Модифікація методу визначення сумарної антиоксидантної активності крові" [Промыслов М. Ш., Демчук М. Л. // Вопросы медицинской химии. - 1996. - Т. 36. - 4. - С. 90-92]. Він полягає в оцінці ЗАА рідини, що досліджується, шляхом визначення її інгібуючого впливу на вільнорадикальне окислення в модельній системі з ліноленовою кислотою, в якій окислення індукується доданням FeSO_4 .

Недоліки: а) неоднорідність і мала стійкість емульсії цієї кислоти в розчині, в результаті чого виникає значна розбіжність в даних; б) використання малодоступного субстрату окислення; в) використання лінолеату обмежує можливість дослідження процесів перекисного окислення інших ненасичених жирних кислот, які зустрічаються в природних субстратах (фосфоліпіди плазми, мембрани клітин тощо), г) низька достовірність способу відносно природних біосубстратів перекисного окислення.

Відомий також спосіб контролю антиоксидантної активності профілактичних і лікувальних антиоксидантних засобів [Пат. РФ № 2182706, G01N33/15, G01N33/52, пр. 15.01.2001. Опубл. 20.05.2002]. Він полягає в оцінці ЗАА антиоксидантного препарату, що досліджується, шляхом визначення його інгібуючого впливу на вільнорадикальне окислення в модельній системі, яка складається з поліненасичених жирних кислот кукурудзяного масла, в якій окислення індукується ініціаторами окислення за певний проміжок часу в стандартних умовах з наступним комплексним визначенням ЗАА методами спектрофотометрії і хемілюмінесценції за кількістю утворених продуктів перекисного окислення ліпідів. При цьому показник ЗАА, виражений в убіхінонових одиницях, обернено пропорційний рівню продуктів перекисного окислення ліпідів.

До недоліків способу можна віднести: а) залежність відтворення результатів від умов зберігання і ступеня початкового окислення субстрату, що унеможлиблює стандартизацію вимірювань; б) низька достовірність способу відносно природних біосубстратів перекисного окислення; в) висока трудомісткість способу завдяки комплексному використанню двох методів визначення ЗАА - спектрофотометричному і хемілюмінесцентному.

Найбільш близьким до заявленого є "Спосіб оцінки протизапальної активності цитокінів" [див. Пат. РФ № 2150113, G01N33/52, пр. 1999.01.28, Опубл. 2000.05.27]. Він полягає в тому, що в модельній системі гемоглобін - пероксид водню - люмінол проводять оцінку інгібування вільних ра-

дикалів цитокінами, для чого визначають показник інтенсивності хемілюмінесценції в модельній системі, після чого до неї цитокін додають, який досліджують, і повторюють визначення інтенсивності хемілюмінесценції. При зниженні даного показника на 50 % і більше відносно початкового рівня оцінюють активність цитокіну як протизапальну.

Недоліки способу: а) досить великий час вимірювання показника ЗАА за рахунок того, що люмінесценція люмінолу розвивається впродовж 1-2 годин, флуоресценцію реєструють певний час до досягнення максимуму, і при реєстрації люмінесценції існує латентний період і "плато" затримки; б) складність модельної системи, яка потребує застосування каталізатора (Fe^{2+}) для пришвидшення протікання реакції; в) обмеженість застосування способу при роботі з біологічними рідинами, забарвлення або каламутність яких перешкоджає отриманню достовірних результатів.

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалити відомий спосіб визначення ЗАА біологічного зразка шляхом прямого використання люмінесцентного агента, що зв'язується з низькомолекулярними білками плазми крові, який спеціально вводять в плазму або сироватку і реєструють кінетику його гасіння. Тим самим досягається скорочення часу вимірювання показника ЗАА, спрощується модельна система і розширюються межі застосування способу.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі експрес-визначення загальної антиоксидантної активності озонованої плазми крові хворих, який включає оцінку інактивації вільних радикалів з використанням люмінесцентного агента, згідно з корисною моделлю, як люмінесцентний агент вибирають продукт взаємодії фенілового ефіру N-метилакридинійкарбонової кислоти і пероксиду водню в середовищі карбонатного буферного розчину (рН 9,93), а загальну антиоксидантну активність плазми оцінюють за допомогою реєстрації кінетики гасіння люмінесценції люмінесцентного агента в розчині плазми крові в умовних одиницях ($\text{с}^{-1}\text{мкл}^{-1}$) з формуванням кривих гасіння і обчисленням по них питомої сталої швидкості гасіння хемілюмінесценції ($K_{\text{CLпит}}$).

Пероксид водню реагує з сіллю N-метилакридинійкарбонової кислоти і продукт, який при цьому утворюється (пероксиоксидне N-метилакридинійкарбонової кислоти) розпадається з певною швидкістю і випромінює кванти світла. Саме цей продукт виявляє чутливість до відновлювачів (донорів електронів), які містяться в біологічній рідині (плазмі крові). Чим більше антиоксидантів в плазмі, тим повільніше йде розпад люмінесцентного агента і, відповідно, швидкість згасання люмінесценції.

Як показник ЗАА плазми (або сироватки) крові використовують так звану питому сталу швидкості

гасіння хемілюмінесценції ($K_{\text{CLпит}}$), величина якої є обернено пропорційною загальній активності

оксидантів плазми. Параметр $K_{\text{CLпит}}$ є інтегральним показником, який реагує на наявність в плазмі (сироватці) всіх можливих оксидантів, як низько-,

так і високомолекулярних, і дозволяє таким чином отримати найбільш повну інформацію про резервні можливості антиоксидантної системи організму хворого.

Використання люмінесцентного агента, основною діючою речовиною якого є феніловий ефір N-метилакридинійкарбонової кислоти і як показник ЗАА плазми крові - питомої сталої швидкості гасіння хемілюмінесценції ($K_{CL,пит}$), дозволяє:

- скоротити час вимірювань до 1-2 хв.;
- спростити систему за рахунок виключення з неї каталізатора;
- розширити межі застосування методу за рахунок забезпечення можливості вимірювання забарвлених і каламутних зразків.

Спосіб визначення ЗАА плазми озонованої крові хворих здійснюється таким чином.

У пацієнта натще з кубітальної вени в асептичних умовах відбирають 3 мл крові в 5-мл шприц, який містить антикоагулянт (0,06 мл гепарину). Плазму відокремлюють від клітин крові центрифугуванням 5 хв. при 800 g.

В центрифугальні пробірки відбирають різні об'єми плазми (від 0,1 до 0,3 мл), доводять їх об'єм до 2 мл карбонатним буферним розчином (рН = 9,93) та додають 0,2 мл 5 %-го водного розчину H_2O_2 . Безпосередньо перед вимірюванням до кожної суміші додають 0,2 мл розчину люмінесцентного агента.

Як люмінесцентний агент вибирають систему феніловий ефір N-метилакридинійкарбонієвої кислоти - пероксид водню в середовищі карбонатного буферного розчину (рН 9,93) [Weeks I., Behehti I., McCapra F. et al. // Clin. Chem. - 1983. - № 29. - P. 1474].

Кинетику гасіння люмінесценції агента в плазмі реєструють впродовж 2 хв. на довжині хвилі 400 нм на хемілюмінометрі або спектрофлуориметрі, який працює в режимі біохемілюмінометра. По отриманих показниках будують криві гасіння. Криві гасіння люмінесценції логарифмують, тангенс кутів нахилу отриманих прямих ділять на відповідні об'єми плазми, і, таким чином, отримують питомі сталі швидкості гасіння хемілюмінесценції ($K_{CL,пит}$). З отриманих для кожної концентрації плазми $K_{CL,пит}$ даних вираховують середнє значення, величина якого виражається в $с^{-1}мкл^{-1}$ і є обернено пропорційною загальній активності оксидантів плазми.

Практичне застосування способу ілюструють наступні приклади.

Приклад 1. Застосування способу експрес-визначення ЗАА озонованої плазми крові хворих для визначення ефективності введення в організм пацієнтів озонованого фізіологічного розчину (ОФР).

Пацієнт Щ., 55 років, д-з: ішемічна хвороба серця (ІХС), гіпертонічна хвороба (ГХ) ІІА ст., синдром хронічної втоми, загострення хронічного обструктивного бронхіту.

При первинному обстеженні крові 8.06.2010 р. визначено величину $K_{CL,пит} = 4,2 \times 10^{-5} с^{-1}мкл^{-1}$, яка для даного пацієнта прийнята за контрольну.

При першому введенні ОФР в дозі 4 мг/л цей показник знизився до значення $2,5 \times 10^{-5} с^{-1}мкл^{-1}$. Далі озонотерапія проводилась щоденно шляхом введення внутрішньовенно ОФР в поступово зростаючих концентраціях (з 4 до 12 мг/л) з дискретністю підвищення дози 2 мг/л. При цьому клініко-лабораторні показники значно покращились, а контрольне дослідження показника ЗАА плазми крові 13.06.2010 р. показало, що показник ЗАА підвищився до значення $4,2 \times 10^{-5} с^{-1}мкл^{-1}$ і далі не зростав. Тому на останніх процедурах пацієнту вводили ОФР з поступовим зниженням дози озону до 7 мг/л. Такий підхід, з визначенням максимально комфортної для хворого дози розчиненого озону дозволив покращити показники гемодинаміки, ліквідувати бронхіт з астматичним компонентом і стимулювати імунну систему, ліквідувати клінічні прояви синдрому хронічної втоми.

Приклад 2. Застосування способу експрес-визначення ЗАА озонованої плазми крові хворих для визначення ефективності сумісної дії процедур ОФР і ВАГОТ.

Пацієнт А., 21 рік, д-з: хронічний протозойно-бактеріальний уретропростатит.

При первинному обстеженні крові 18.03.2010 р. визначено величину

$K_{CL,пит} = 2,7 \times 10^{-5} с^{-1}мкл^{-1}$, яка для даного пацієнта прийнята за контрольну.

Почато курс озонотерапії 18.03.2010 р. з введення ОФР з мінімальною концентрацією розчиненого озону 2 мг/л. 18.03.2010 р. взято контрольну пробу крові і визначено, що показник $K_{CL,пит}$ зни-

звився до значення $0,6 \times 10^{-5} с^{-1}мкл^{-1}$. Після цього через день проводили процедуру ВАГОТ з поступово зростаючими дозами озону від 6 до 20 мг/л. Останню було досягнуто 30.03.2010 р. на 6-й процедурі. Було взято кров для аналіз і визначено значення показника $K_{CL,пит} = 10,3 \times 10^{-5} с^{-1}мкл^{-1}$.

Цю концентрацію було визнано нами максимально припустимою для даного пацієнта. Наступне поступове зниження вмісту озону к 12-й процедурі ВАГОТ показало збереження показника $K_{CL,пит}$ на рівні $6,9 \pm 1,5 с^{-1}мкл^{-1}$. Клініко-лабораторні показники підтвердили правильність обраної нами тактики лікування.

Приклад 3. Застосування способу експрес-визначення ЗАА озонованої плазми крові хворих для визначення ефективності процедури великої аутогемооозотерапії (ВАГОТ).

Пацієнт Л., 26 років, д-з: хронічний протозойно-бактеріальний уретропростатит.

В комплексному лікуванні було застосовано метод озонотерапії шляхом проведення 12-кратного (через день) озонування крові (ВАГОТ).

Перед курсом ВАГОТ 28.03.2010 р. у хворого було взято кров, яка вважалась контрольним зразком. Початкове значення показника ЗАА становило $3,8 \times 10^{-5} с^{-1}мкл^{-1}$.

Курс озонотерапії хворий переносив добре, тому до 7-ї процедури концентрацію озону було підвищено до 30 мг/л. Значення показника при цьому сягнуло $10,7 \times 10^{-5} \text{ с}^{-1} \text{ мкл}^{-1}$, але надалі почало дещо знижуватись, зостаючись на досить високому рівні ($9,5 \pm 1,5 \text{ с}^{-1} \text{ мкл}^{-1}$). Тому подальше проведення ВАГОТ проводили з поступовим зниженням концентрації розчиненого озону, яка до 26.04.2010 р. (12-та процедура) досягла значення 5 мг/л. Показник ЗАА плазми крові при цьому ста-

новив $9,3 \pm 1,5 \text{ с}^{-1} \text{ мкл}^{-1}$. У даного пацієнта було отримано найбільш виражений позитивний клініко-лабораторний ефект від лікування.

Таким чином, як витікає з наведених прикладів, спосіб експрес-визначення ЗАА озонованої плазми крові хворих, який нами заявляється, дозволяє швидко визначати показник ЗАА крові у пацієнтів і оперативно корегувати цей процес при проведенні процедур озонотерапії.