



УКРАЇНА

(19) UA (11) 50567 (13) A

(51) 6 G01N33/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ГЕНЕРАЦІЇ СУПЕРОКСИДНОГО АНІОН-РАДИКАЛУ ФАГОЦИТУЮЧИМИ КЛІТИНАМИ КРОВІ

1

2

(21) 2002021171

(22) 13 02 2002

(24) 15 10 2002

(46) 15 10 2002, Бюл. № 10, 2002 р

(72) Войтович Олександр Васильович, Недельська
Світлана Миколаївна, Поливода Сергій
Миколайович, Черепок Олександр Олексійович(73) ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ, Войтович Олександр Васильович,
Недельська Світлана Миколаївна, Поливода
Сергій Миколайович, Черепок Олександр
Олексійович(57) Спосіб визначення рівня генерації
супероксидного аніон-радикала фагоцитуючими
клітинами крові, що полягає у розділенні
фагоцитуючих клітин крові на моноцити та
поліморфно-ядерні лейкоцити за допомогою
градієнта щільності фікол-тріомбаста, додаванні
до фагоцитуючих клітин крові 0,2 % розчину
нітросинього тетразолію, додаванні до реакційноїсуміші 2 М розчину гідроксиду калію та
диметилсульфоксиду, вимірюванні оптичної
щільності розчину формазану за допомогою
спектрофотометра та визначенні кількості
формазану, який відрізняється тим, що
паралельно аналізують суспензію моноцитів та
поліморфно-ядерних лейкоцитів, інкубують
реакційну суміш 20 хвилин, вимірюють оптичну
щільність розчину формазану при 540 нм та
визначають рівень генерації супероксидного аніон-
радикала фагоцитуючими клітинами крові за
формулою

$$X = A / B \times 2 \times 10^3,$$

де, X - рівень супероксидного аніон-радикала (мкМ
на 10^3 фагоцитуючих клітин крові),

A - кількість формазану у пробі (мкМ),

B - абсолютний вміст фагоцитуючих клітин крові у
пробі,2, 10^3 - алгебраїчні коефіцієнти

Винахід стосується медицини, а саме
лабораторної діагностики і може бути
використаний для визначення рівня генерації
супероксидного аніон-радикала фагоцитуючими
клітинами крові, як у нормі, так і при різних
захворюваннях внутрішніх органів

Фагоцитуючі клітини крові і органів людини є
основним джерелом вільних радикалів в організмі.
При цьому, супероксидний аніон-радикал, як
первинний радикал, дає початок іншим -
вторинним радикалам, які характеризуються
значною реакційною спроможністю. Вільні
радикали, як фактори неспецифічного захисту,
беруть активну участь у бактерицидній та
цитотоксичній активності фагоцитуючих клітин,
здійснюючи деструкцію макромолекул
(мембранних білків та ліпідів, ферментів і
нуклеїнових кислот) бактеріальних клітин і
пухлинних клітин власного організму. Важлива
бактерицидна і цитотоксична активність вільних

радикалів дещо затьмарюється їхнім руйнівним
впливом на аутологічні макромолекули та клітини
в основному у тих тканинах, де відбувається
надмірна їх генерація при будь-якому запальному
процесі. Тому, контроль за рівнем вільних
радикалів в організмі, і насамперед - за рівнем
генерації супероксидного аніон-радикала
фагоцитуючими клітинами при захворюваннях
внутрішніх органів, дозволить вчасно вжити
терапевтичних заходів щодо регуляції їх низького
або надто високого рівня в організмі.

Відомий спосіб визначення генерації
супероксидного аніон-радикала фагоцитуючими
клітинами, що полягає у наступному

1 Отримують кров, стабілізовану гепарином
(200Од/мл), стандартним способом

2 0,1мл крові змішують з 0,1мл 0,1% розчину
нітросинього тетразолію

3 Інкують реакційну суміш 30 хвилин при
37 С

(13) A

(11) 50567

(19) UA

4 Із реакційної суміші готують мазки середньої густини, шляхом розподілення її на предметному склі

5 Мазки фіксують стандартним способом

6 Мазки фарбують нейтральним червоним стандартним способом

7 Підраховують 100 нейтрофілів під іммерсією, за допомогою світлового мікроскопу

8 Нейтрофіли, що містять гранули формазану розподіляють по ступеням в залежності від об'єму, який займають гранули відносно цитоплазми клітин

9 Розраховують середній цитохімічний індекс вмісту формазану у нейтрофілах, стандартним способом

10 Визначають рівень генерації супероксидного аніон-радикала фагоцитуючими клітинами крові за показником їх цитохімічного індекса

(Герасимов І.Г., Игнатов Д.Ю. Функциональная неравнозначность нейтрофилов крови человека генерация активных форм кислорода // Цитология -2001 -Т 43 -К 5 -С 432 - 436) Суттєвими ознаками аналогу і винаходу, що збігаються є такі

1 Проведення лабораторного дослідження

2 Додавання до реакційної суміші розчину нітросинього тетразолію

Незважаючи на технічну простоту виконання вказаного способу визначення генерації супероксидного аніон-радикала фагоцитуючими клітинами крові, існує значна імовірність хибного визначення рівня генерації супероксидного аніон-радикала фагоцитуючими клітинами крові. Це відбувається через те, що визначення рівня генерації супероксидного аніон-радикалу фагоцитуючими клітинами крові, через облік результату безпосередньо у мазку, не завжди дає змогу чітко розрізнити між собою нейтрофіли і моноцити. Відомо, що моноцити здатні до генерації супероксидного аніон-радикалу у значній кількості і тому, їх присутність у мазку може призводити до виникнення хибно завищених результатів визначення рівня генерації супероксидного аніон-радикала фагоцитуючими клітинами крові. Крім того, наявність суб'єктивності при розрахунку результатів є додатковим негативним фактором, що значно погіршує точність і достовірність оцінки рівня генерації супероксидного аніон-радикала фагоцитуючими клітинами крові, а також негативно впливає на відображення результатів дослідження

Найбільш близьким за технічною суттєвістю та досягаємим результатом є спосіб визначення генерації супероксидного аніон-радикала фагоцитуючими клітинами крові, що полягає у наступному

1 Отримують 3мл крові, стабілізованої цитратом натрію стандартним способом

2 Розділяють фагоцитуючі клітини крові на моноцити та поліморфно-ядерні лейкоцити, за допомогою градієнта щільності фікол-тріомбраз (щільність $1,080\text{г/см}^3$) стандартним способом

3 Відмивають суспензію моноцитів тричі у фосфатно-сольовому буфері (рН-7,4) стандартним способом

4 Підраховують кількість моноцитів у суспензії стандартним способом

5 Вносять у пробірку 1мл суспензії з відомою кількістю моноцитів

6 Центрифугуванням осаджують моноцити, надосадову рідину відбирають

7 До моноцитів додають 0,1мл 0,2% розчину нітросинього тетразолію

8 Додають до реакційної суміші 0,1мл фосфатно-сольового буферного розчину

9 Інкують пробірку з реакційною сумішшю 1 годину при 37°C

10 Центрифугують реакційну суміш, надосадову рідину відбирають

11 Осад клітин фіксують метанолом 10 хвилин

12 Осад двічі промивають фосфатно-сольовим буфером

13 До реакційної суміші додають 1,38мл 2М розчину гідроксиду калію і 1,62мл диметилсульфоксиду

14 Вимірюють оптичну щільність розчину формазану при 492нм у кюветі товщиною 1см за допомогою спектрофотометра

15 Визначають кількість формазану за калібровочним графіком, побудованим на основі даних оптичної щільності, отриманих при відновленні стандартних розчинів нітросинього тетразолію різних концентрацій у суміші розчинів гідроксиду калію і диметилсульфоксиду

16 Визначають рівень генерації супероксидного аніон-радикала фагоцитуючими клітинами крові (моноцитами) за кількістю формазану

(Мельников В.П. Тест восстановления нитросинего тетразолия мононуклеарными фагоцитами // Лабораторное дело -1991 -N 8 -С 51 - 53)

Суттєвими ознаками прототипу і винаходу, що збігаються, є такі

1 Розділення фагоцитуючих клітин крові на моноцити та поліморфно-ядерні лейкоцити за допомогою градієнта щільності фікол-тріомбраз

2 Додавання до фагоцитуючих клітин крові 0,2% розчину нітросинього тетразолію

3 Додавання до реакційної суміші 2М розчину гідроксиду калію та диметилсульфоксиду

4 Вимірювання оптичної щільності розчину формазану за допомогою спектрофотометра

5 Визначення кількості формазану

Не зменшуючи значення вказаного способу, слід зауважити, що проводячи розділення фагоцитуючих клітин крові на моноцити та поліморфно-ядерні лейкоцити, у способі визначають рівень генерації супероксидного аніон-радикалу тільки моноцитами. Здатність поліморфно-ядерних лейкоцитів до генерації супероксидного аніон-радикалу залишається у цьому способі без уваги, що зменшує інформативність даного способу. Кількість виділених моноцитів у суспензії підраховується у камері Горяєва загальноприйнятим способом, при якому можливе визначення моноцитів тільки за їх розмірами, без оцінки морфології ядра клітин, що робить їх підрахунок недостатньо точним. До того ж, при розрахунку кінцевого результату рівня

продукції супероксидного аніон-радикала на мільйон моноцитів, імовірність хибно-завищеного результату значно зростає. Все це призводить до зменшення достовірності результатів дослідження. Крім того, інкубація суспензії моноцитів з розчином нитросинього тетразолію триває одну годину, що не є загальноприйнятим терміном тривалості інкубації. Відомо, що збільшення терміну інкубації суспензії моноцитів з розчином нитросинього тетразолію приводить до відповідного збільшення рівня відновлення нитросинього тетразолію у формазан. При цьому, залежність між рівнем генерації супероксидного аніон-радикалу та утворенням формазану пропорційна лише до 20 - 30 хвилини. Таким чином інкубація реакційної суміші впродовж однієї години призводить до зниження точності вказаного методу. Процедура приготування стандартних зразків, шляхом зважування мікрограмових кількостей нитросинього тетразолію, вносить додаткових помилок ще й на етапі побудови калібровочного графіка, що значно погіршує відтворюваність і достовірність результатів дослідження.

В основу винаходу поставлено задачу удосконалення способу оцінки генерації супероксидного аніон-радикала фагоцитуючими клітинами крові, шляхом паралельного аналізу суспензії мононуклеарних та поліморфно-ядерних лейкоцитів, зміни довжини хвилі реєстрації оптичної щільності розчину формазану та шляхом додаткових розрахунків за формулою, що дозволить підвищити точність, відтворюваність та достовірність результатів лабораторного дослідження.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі визначення рівня генерації супероксидного аніон-радикала фагоцитуючими клітинами крові, що полягає у розділенні фагоцитуючих клітин крові на моноцити та поліморфно-ядерні лейкоцити за допомогою градієнта щільності фікол-тріомбаст, додаванні до фагоцитуючих клітин крові 0,2% розчину нитросинього тетразолію, додаванні до реакційної суміші 2М розчину гідроксиду калію та диметилсульфоксиду, вимірюванні оптичної щільності розчину формазану за допомогою спектрофотометра та визначенні кількості формазану, новим є те, що паралельно аналізують суспензію моноцитів та поліморфно-ядерних лейкоцитів, інкубують реакційну суміш 20 хвилин, вимірюють оптичну щільність розчину формазану при 540нм та визначають рівень генерації супероксидного аніон-радикала фагоцитуючими клітинами крові за формулою

$$X = A/B \times 10^3,$$

де, X - рівень супероксидного аніон-радикалу (мкМ на 10^3 фагоцитуючих клітин крові),

A - кількість формазану у пробі (мкМ),

B - абсолютний вміст фагоцитуючих клітин крові у пробі,

2, 10^3 - алгебраїчні коефіцієнти

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю ознак, що заявляються, та технічним результатом полягає у наступному визначення рівня генерації супероксидного аніон-радикала лише поліморфно-ядерними лейкоцитами чи моноцитами крові не дає достатньо повної уяви

про інтенсивність генерації вільних радикалів та їх джерела в організмі людини. Тому паралельне визначення здатності поліморфно-ядерних лейкоцитів і моноцитів крові до генерації вказаного радикала, дозволяє достатньо точно визначити їхній внесок до інтенсивності вільнорадикальних реакцій в організмі. Крім того, застосування у розрахунках відомого факту здатності 2Моль супероксидного аніон-радикалу відновлювати 1Моль нитросинього тетразолію дає можливість кількісної (у молях) оцінки генерації супероксидного аніон-радикалу фагоцитуючими клітинами крові і дозволяє суттєво підвищити точність результату оцінки генерації супероксидного аніон-радикала. Таким чином, можливість паралельної оцінки генерації супероксидного аніон-радикала поліморфно-ядерними лейкоцитами та моноцитами крові з кількісним відображенням отриманих результатів, дозволяє оцінити здатність вказаних клітин до генерації супероксидного аніон-радикала з високим ступенем точності, достовірності і відтворюваності результатів лабораторного дослідження.

Для визначення показника норми нами було обстежено 55 практично здорових осіб. Серед обстежених здорових осіб були представлені різні вікові групи (згідно рекомендацій ВОЗ), середній вік склав 38,6±15,3 року, жінок було 37(67,3%), чоловіків - 18(32,7%). Після обчислення результатів обстеження групи здорових осіб, рівень генерації супероксидного аніон-радикала на тисячу фагоцитуючих клітин крові склав 0,46±0,05 (межі коливань від 0,24 до 0,88мкМ), із них, на тисячу поліморфно-ядерних лейкоцитів цей показник склав 0,400±0,045мкМ (межі коливань від 0,2 до 0,82мкМ), на тисячу мононуклеарних лейкоцитів - 0,34±0,04мкМ (межі коливань від 0,13 до 0,78мкМ).

Спосіб здійснюється таким чином

1 Отримують 4мл крові, стабілізовану трилоном Б, стандартним способом

2 Розділяють фагоцитуючі клітини крові на мононуклеарні та поліморфно-ядерні лейкоцити на градієнті щільності фікол-тріомбаст ($1,080\text{г/см}^3$) стандартним способом

3 Збирають у окремі пробірки кільце мононуклеарних лейкоцитів (над розчином градієнта), та поліморфно-ядерні лейкоцити (під шаром розчину градієнту)

4 Отримані суспензії фагоцитуючих клітин крові відмивають тричі і визначають життєздатність мононуклеарних та поліморфно-ядерних лейкоцитів в тесті з трипановим синім-еозином. Суспензії клітин беруть у роботу тільки при кількості життєздатних клітин не менше, ніж 97%

5 Підраховують кількість мононуклеарних і поліморфно-ядерних лейкоцитів в отриманих суспензіях із застосуванням фарби Дозморова-Задорожного

6 Паралельно аналізують суспензію мононуклеарних та поліморфно-ядерних лейкоцитів

7 У окремих пробірках змішують по 0,1мл суспензії мононуклеарних та поліморфно-ядерних

лейкоцитів з 0,1мл 0,2% розчином нитросинього тетразолію

8 Інкують пробірки з реакційною сумішшю 20 хвилин при 37°C

9 Після інкубації реакційну суміш центрифугують, надосадову рідину відбирають

10 Осад клітин тричі відмивають у фосфатно-сольовому буфері

11 Після відмивання до реакційної суміші додають по 0,2мл 2М розчину гідроксиду калію і 0,2мл диметилсульфоксиду

12 Вимірюють оптичну щільність розчину формазану при 540нм у кюветі, товщиною 1см за допомогою спектрофотометра

13 Визначають рівень генерації супероксидного аніон-радикала фагоцитуючими клітинами крові, за формулою

$$X = A/B \times 10^3$$

де, X - рівень супероксидного аніон-радикалу (мкМ) на тисячу фагоцитуючих клітин крові),

A - кількість формазану у пробі (мкМ),

B - абсолютний вміст фагоцитуючих клітин крові у пробі,

2, 10^3 - алгебраїчні коефіцієнти

Приклад Хворий Р 48 років надійшов у пульмонологічне відділення Запорізької обласної клінічної лікарні зі скаргами на слабкість, спітність, головний біль, задуху при найменшому фізичному навантаженні, кашель з харкотинням. Вважає себе хворим на протязі 22 років, коли після переохолодження, на тлі фебрильної температури з'явився кашель з харкотинням, задуха, що виникала при незначному фізичному навантаженні. Згодом хворий тричі знаходився на стаціонарному лікуванні з приводу хронічного бронхіту, одержував антибактеріальну, протизапальну та бронхолітичну терапію. За тиждень до надходження в клініку, після перенесеної гострої респіраторної вірусної інфекції, з'явилися вищезазначені скарги на тлі підвищеної температури, і хворий був госпіталізований для лікування загострення захворювання. Анамнез життя - без особливостей, спадкової патології в родині не виявлено. Пацієнт палить на протязі 30 років, інші шкідливі звички заперечує, алергологічний анамнез не обтяжений. Об'єктивно спостерігаються наступні зміни. При огляді відзначається участь допоміжних м'язів в акті дихання. При пальпації голосове тремтіння дещо послаблене, верхівковий поштовх визначається нечітко. Перкуторно - над всією поверхнею легених полів звук з коробковим відтінком, аускультативно - діяльність серця правильна, тони приглушені, в легенях дихання жорстке, велика кількість розсіяних сухих та вологих хрипів, більше у нижніх відділах. Частота дихання 26 за 1 хвилину, дихання поверхневе. Артеріальний тиск у момент надходження 155/95мм рт.ст., пульс 74 удари за хвилину, задовільних властивостей. На електрокардіограмі - ознаки гіпертрофії міокарду правого шлуночка, порушення процесів реполяризації в правих грудних відведеннях, неповна блокада правої ніжки пучка Гіса. При ехокардіографічному дослідженні спостерігається збільшення порожнини правого шлуночка, потовщення

передньої стінки правого шлуночка та міжшлуночкової перетинки, парадоксальний рух міжшлуночкової перетинки у систолу, помірне зниження скоротливих властивостей лівого шлуночка. При рентгенологічному дослідженні у легенях посилений судинний малюнок, корені структурні, тяжисті з обох сторін. Бронхоскопічно виявлені ознаки ендобронхіту. Спирографічне дослідження виявило порушення вентиляції за обструктивним типом. При лабораторному дослідженні - харкотиння слизисто-гнійне, лейкоцити на дві третини поля зору. Враховуючи скарги хворого, клінічну картину захворювання, дані об'єктивного дослідження та зважаючи на результати додаткових методів дослідження, хворому був поставлений клінічний діагноз - Хронічний обструктивний бронхіт, загострення. Емфізема. Пневмосклероз. Легенева недостатність III ступеня. Недостатність кровообігу II-а стадії. Для визначення стану кисень-залежного метаболізму лейкоцитів хворого, було проведено визначення рівня генерації супероксидного аніон-радикалу фагоцитуючими клітинами крові загальновідомим, та запропонованим нами способом. Після визначення рівня генерації супероксидного аніон-радикалу фагоцитуючими клітинами крові, цитохімічний індекс склав 1,28од (верхня межа норми - 1,1од), що свідчило про високий рівень генерації супероксидного аніон-радикалу фагоцитуючими клітинами крові, але такий значний показник рівня генерації супероксидного аніон-радикалу фагоцитуючими клітинами крові не відповідав стану хворого, у якого були клінічні ознаки імунodefіциту. Тому вказаний результат визначення генерації супероксидного аніон-радикалу фагоцитуючими клітинами крові слід було б вважати артефактом у даного хворого, та він не може бути використаний у лікувально-діагностичному процесі. Після визначення рівня генерації супероксидного аніон-радикалу фагоцитуючими клітинами крові запропонованим нами способом, рівень генерації супероксидного аніон-радикалу фагоцитуючими клітинами крові склав 0,97мкМ, в тому числі у перерахунку на тисячу поліморфно-ядерних і моноцитів, цей показник склав відповідно 0,38мкМ та 0,72мкМ, тобто був в межах норми (для поліморфно-ядерних лейкоцитів) і в районі верхньої межі норми (для моноцитів). Високий рівень генерації супероксидного аніон-радикалу моноцитами, з урахуванням значної інфільтрації ними легеневої тканини, був фактором ризику розвитку оксидативного пошкодження тканин організму і насамперед легеневої тканини і вказував на хронізацію процесу запалення. Отримані дані рівня генерації супероксидного аніон-радикалу фагоцитуючими клітинами крові, дозволили внести корекцію у запроваджену терапію, до якої були додані ліки з групи імуномодуляторів, для стимулювання активності поліморфно-ядерних лейкоцитів. Через 3 тижні комплексного лікування, при контрольному обстеженні, поряд з поліпшенням клінічної картини захворювання і позитивною динамікою даних інструментальних досліджень, спостерігалось збільшення рівня генерації супероксидного аніон-

радикалу фагоцитуючими клітинами крові до 1,23мкМ, в тому числі - поліморфно-ядерними лейкоцитами до 0,64мкМ, генерація супероксидного аніон-радикалу моноцитами майже не змінилась, склавши 0,75мкМ. Таким чином, використання способу, що пропонується,

дозволило з високим ступенем точності та достовірності визначити рівень генерації супероксидного аніон-радикалу, вчасно провести патогенетично-обумовлену терапію і запобігти появі ускладнень.

ДП «Український інститут промислової власності» (Укрпатент)

вул. Сим'ї Хохлових, 15, м. Київ, 04119, Україна

(044) 456 – 20 – 90

ТОВ «Міжнародний науковий комітет»

вул. Артема, 77, м. Київ, 04050, Україна

(044) 216 – 32 – 71