



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **81417**

(13) **U**

(51) МПК

**G09B 23/28** (2006.01)

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2013 01319**

(22) Дата подання заявки: **04.02.2013**

(24) Дата, з якої є чинними  
права на корисну  
модель: **25.06.2013**

(46) Публікація відомостей  
про видачу патенту: **25.06.2013, Бюл.№ 12**

(72) Винахідник(и):

**Криницька Інна Яківна (UA),  
Марущак Марія Іванівна (UA)**

(73) Власник(и):

**ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ  
МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.Я.  
ГОРБАЧЕВСЬКОГО,  
Майдан Волі, 1, м. Тернопіль, 46001 (UA)**

## (54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ МЕМБРАННОЇ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ІЗОЛЬОВАНИХ КЛІТИН КРОВІ ПРИ МОДЕЛЮВАННІ ПАТОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

### (57) Реферат:

Спосіб визначення мембранної резистентності ізольованих клітин крові при патологічному процесі включає визначення характеру цитолізу лейкоцитів, причому додатково в моноцитах визначають вміст активних форм кисню, кількість моноцитів із зниженим мітохондріальним трансмембранним потенціалом за даними цитофлюорометричного аналізу та концентрацію продуктів тіобарбітурової кислоти спектрофотометричним методом, причому діагностичний висновок роблять за інтегральним індексом мембранорезистентності як обернено пропорційної середній кубічній вказаних показників.

**UA 81417 U**



Корисна модель належить до медицини і цитології, зокрема клінічної лабораторної діагностики, і може бути використана в експериментальній патології і широкій медичній практиці при проведенні діагностичних досліджень.

Відомий спосіб визначення мембранної резистентності ізольованих клітин крові, при моделюванні патологічного процесу, який включає відтворення умов взаємодії клітин нативної крові з цитолітичним чинником [1]. За відомим способом, мембранну резистентність ізольованих клітин крові вивчають за характером цитолізу лейкоцитів під впливом чинників різного характеру, наприклад токсичного або/і імуногенного, за методом цитолюмінесцентного аналізу.

Недоліком відомого способу є недостатній рівень інформативності і точності діагностичного дослідження, що випливає із участі в діагностичній реакції одночасно значної кількості клітин та із обмеження його даними лише про рівень цитолітичної деформації лейкоцитів як чинник мембранодеструктивної дії, перш за все, за умов патологічного процесу, тоді як внутрішньоклітинні механізми залишаються поза увагою.

В основу корисної моделі поставлено задачу вдосконалити відомий спосіб, в якому шляхом введення додаткових технологічних прийомів дослідження клітинної резистентності, спрямованих на виявлення прихованих механізмів пошкодження клітинних мембран, особливо в аспекті її формування і розвитку в ході патологічного процесу, досягають підвищення інформативності і точності діагностичного дослідження.

При вирішенні технічної задачі було взято до уваги те, що ранніми ознаками початку вільнорадикального ланцюгового окиснення є пошкодження клітинних мембран, яке відбувається внаслідок надмірної генерації активних форм кисню у мітохондріях, які модифікують макромолекули ферментних білків і нуклеїнові кислоти, а також фосфоліпідні мембрани цих та інших органел [2]. Пошкоджені мітохондрії зазвичай виступають постійним джерелом агресивних продуктів порушеного метаболізму і власних компонентів, здатних негативно впливати на внутрішньоклітинні процеси, ініціюючи порушення мембранної резистентності клітин крові [3].

Виходячи з наведених міркувань, у відомому способі оцінки мембранної резистентності ізольованих клітин крові при моделюванні патологічного процесу, що включає визначення характеру цитолізу лейкоцитів, відповідно до корисної моделі, додатково у моноцитах визначають вміст активних форм кисню і кількість моноцитів зі зниженим мітохондріальним трансмембранним потенціалом за даними цитофлуорометричного аналізу та концентрацію продуктів тіобарбітурової кислоти спектрофотометричним методом, причому діагностичний висновок роблять за інтегральним індексом мембранорезистентності ( $I_{mr}$ ) як обернено пропорційної середній кубічній вказаних показників за допомогою формули:

$$I_{mr} = 100 / \sqrt[3]{r \cdot \varphi \cdot t}, \quad (1)$$

де  $r$  - показник вмісту активних форм кисню, %;

$\varphi$  - число моноцитів із зниженим мітохондріальним трансмембранним потенціалом, %;

$t$  - показник рівня продуктів тіобарбітурової кислоти, ммоль/л.

Спосіб здійснюють наступним чином. У лабораторної тварини набирають кров на аналіз: по 0,70 мл до і після відтворення патологічного процесу. Далі за методикою проточної цитофлуорометрії визначають послідовно показники вмісту активних форм кисню  $r$  (%) і зниження мітохондріального трансмембранного потенціалу  $\varphi$  (%), а методом спектрофотометрії - рівень продуктів тіобарбітурової кислоти (ммоль/л).

Отримані дані заносять у робочу таблицю, після чого, користуючись формулою 1, визначають інтегральний індекс мембранорезистентності ( $I_{mr}$ ), за рівнем якого оцінюють пошкодження мітохондріальних мембран моноцитів при вибраному патологічному процесі.

Приклад 1. На статевозрілому щурі-самці масою 210 г моделюють гепатопульмональний синдром. Тварину анестезують внутрішньоочеревинним введенням тіопенталу натрію в дозі 40 мг/кг маси тварини. Модель створюють шляхом накладання подвійної лігатури на загальну жовчовивідну протоку і подальшого її пересічення скальпелем [4]. Виконавши розріз під мечовидним відростком, загальну жовчовивідну протоку відділяють від розташованих поруч тканин, накладають подвійну лігатуру, вище і нижче місця планованого перерізу. Потім загальну жовчовивідну протоку пересікають скальпелем. Для виявлення загальної жовчовивідної протоки визначають її анатомічне розташування: вона знаходиться вище ворітної вени, виходячи з воріт печінки у вигляді Y-подібної форми, об'єднує гілочки обох дольових проток. В контрольній групі тварин загальну жовчовивідну протоку відділяють від тканин, але не пересікають. Післяопераційну рану пошарово, наглухо зашивають. На 31-у добу після операції тварин

виводять з експерименту під тіопенталовим наркозом. Популяцію моноцитів крові отримують за допомогою центрифугування на подвійному градієнті щільності 1,077 і 1,093 фіколу-верографіну. Після 40 хв. центрифугування при температурі 4 °С і швидкості 1500 об/хв. утворюються дві інтерфази. Верхня інтерфаза (на межі плазма-верифікол щільністю 1,077) складається із моноклеарних клітин - 80 % лімфоцитів, 15-18 % моноцитів і незначного (2-3 %) додатка гранулоцитів. Розділення лімфоцитів і моноцитів здійснюють методом ізокінетичного центрифугування протягом 5 хв. при 400 об/хв. в градієнті фіколу-верографіну щільністю 1,060 [5]. Методом проточної цитофлуориметрії визначають рівень активних форм кисню моноцитів і трансмембранний мітохондріальний потенціал, методом спектрофотометрії – концентрацію продуктів тіобарбітурової кислоти. Рівень активних форм кисню моноцитів складав 60,5 (%), кількість моноцитів із зниженим мітохондріальним трансмембранним потенціалом - 4,1 (%), концентрація продуктів тіобарбітурової кислоти - 6,6 (ммоль/л). Розрахували  $I_{cd}$  за допомогою формули 1, а саме:

$$I_{mr} = 100 / \sqrt[3]{60,5 \cdot 4,1 \cdot 6,6} = 8,4.$$

Приклад 2. Запропонованим способом оцінювали рівень мембранорезистентності моноцитів при патологічному процесі у 6 білих статевозрілих нелінійних щурів масою 200-220 г. Рівень мембранної резистентності у вигляді зазначених діагностичних показників наведено у таблиці.

Таблиця

Рівень мембранорезистентності моноцитів крові у щурів із гепатопульмональним синдромом

№ п/п	Контрольна група				Дослідна група			
	г, %	ф, %	t, ммоль/л	$I_{mr}$	г, %	ф, %	t, ммоль/л	$I_{mr}$
1	14,8	1,54	2,43	26,3	50,3	2,88	6,9	10,0
2	44	0,77	1,71	25,6	58,5	3,17	9,85	8,1
3	45,3	0,9	1,82	23,8	88,4	2,89	6	8,6
4	35,4	1,28	2,15	21,7	78	4,76	11,05	6,3
5	51,2	1,79	2,73	15,9	60,5	4,09	6,6	8,4
6	28,8	2,05	2,43	19,2	78,3	3,06	6	8,8
M±m	35,6±2,2	1,4±0,4	2,2±0,3	22,1±0,9	69,0±1,8	3,5±0,4	7,7±0,8	8,4±0,4

В результаті, встановлено, що індекс мембранорезистентності моноцитів при експериментальному гепатопульмональному синдромі достовірно перевищував ( $p < 0,001$ ) дані контрольної групи. Наведені дані засвідчують високу точність дослідження та інформативність показників.

Отже, запропонований спосіб забезпечує вищий, ніж за відомим способом-прототипом, рівень точності та інформативності, і може бути застосований в клініко-лабораторній практиці та експериментальних дослідженнях.

Джерела інформації:

1. Пат. 46268U, МПК А61В 5/00. Спосіб визначення мембранної резистентності ізольованих клітин крові / Л. С Мілевська-Вовчук, С І. Шкробот, В. В. Дем'яненко. - № у 200907418; заявл. 15.07.09, опубл. 10.12.09, Бюл. № 23.

2. Davies K. J. A. The last 20 years: The most highly cited papers / K. J. A. Davies, W. A. Pryor // Free radical biology & medicine.-2005. - Vol. 39, № 10. - P. 1263-1290.

3. Колісник М. І. Активні форми кисню та їх роль у метаболізмі клітини / М. І. Колісник, Г. В. Колісник, Є. Нідзюлка, В. В. Влізло // Біологія тварин.-2009. - Т. 11, № 2. - С. 59-70.

4. Fallon M. B. Common bile duct ligation in the rat: a model of intrapulmonary vasodilatation and hepatopulmonary syndrome / M. B. Fallon, G. A. Abrams, J. W. McGrath et al. // Am. J. Physiol.-1997. - Vol. 272. - P. 779-784.

5. Нейко Є. М. Кисеньзалежні функції фагоцитів у хворих на хронічне обструктивне захворювання легень / Є. М. Нейко, П. Р. Герич, М. М. Островський, Л. М. Томащук // Здобутки клінічної і експериментальної медицини.-2010. - № 1. - С. 100-104.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб визначення мембранної резистентності ізольованих клітин крові при патологічному процесі, що включає визначення характеру цитолізу лейкоцитів, який **відрізняється** тим, що додатково в моноцитах визначають вміст активних форм кисню, кількість моноцитів із зниженим

мітохондріальним трансмембранним потенціалом за даними цитофлюорометричного аналізу та концентрацію продуктів тіобарбітурової кислоти спектрофотометричним методом, причому діагностичний висновок роблять за інтегральним індексом мембранорезистентності ( $I_{mr}$ ) як обернено пропорційної середній кубічній вказаних показників за допомогою формули:

5 
$$I_{mr} = 100 / \sqrt[3]{r \cdot \varphi \cdot t} \quad (1)$$

де  $r$  - показник вмісту активних форм кисню, %;

$\varphi$  - число моноцитів із зниженим мітохондріальним трансмембранним потенціалом, %;

$t$  - показник рівня продуктів тіобарбітурової кислоти, ммоль/л.

---

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601