



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **76026** (13) **U**
(51) МПК
G01N 33/48 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки:	u 2012 05648	(72) Винахідник(и):	Король Леся Вікторівна (UA), Мигаль Людмила Якимівна (UA)
(22) Дата подання заявки:	08.05.2012	(73) Власник(и):	ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ НЕФРОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ", вул. Дегтярівська, 17-в, м. Київ, 04050 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель:	25.12.2012		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	25.12.2012, Бюл.№ 24		

(54) СПОСІБ ІНТЕГРАЛЬНОЇ ОЦІНКИ ОКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОГО БАЛАНСУ У СИРОВАТЦІ КРОВІ

(57) Реферат:

Спосіб інтегральної оцінки оксидантно-антиоксидантного балансу у сироватці крові належить до медицини. Спосіб може бути використаний у дітей та дорослих в умовах клініки, а також в експериментальних дослідженнях для оцінки перебігу та прогнозу хвороби. Лікування можна проводити шляхом оцінки метаболічних зрушень та ефективності їх корекції.

UA 76026 U

Корисна модель належить до галузі медицини, зокрема до лабораторної діагностики (клінічної біохімії), і може бути використана для інтегральної оцінки оксидантно-антиоксидантного балансу у сироватці крові як в клініці, так і в експерименті, як у дорослих, так і у дітей.

У нормі активні форми кисню є важливим елементом резистентності організму. У той же час активні форми кисню можуть здійснювати індукування процесів перекисного окислення ліпідів біологічних мембран, що є необхідним етапом функціонування кожної клітини будь-якого організму. Зміни природного рівня перекисного окислення ліпідів як у бік гальмування, так і у бік активації, стають для мембран пошкоджуючим фактором, а надлишок продуктів перекисного окислення ліпідів є токсичним для біосистем клітини та призводить до їх оксидативного ураження. Внутрішньоклітинний захист від вільних радикалів здійснюється завдяки функціонуванню ферментативної та неферментативної ланок антиоксидантної системи. Дисбаланс системи "оксиданти-антиоксиданти" грає ключову роль у розвитку різних патологічних станів та є ознакою оксидативного стресу. Останнім часом активно ведеться пошук інтегрального показника для оцінки дисбалансу оксидантно-антиоксидантної системи як міри метаболічної відповіді організму на патологічний процес та виразності оксидативного стресу.

Відомо теоретичне та практичне значення дослідження активності процесів перекисного окислення ліпідів та захисної ролі антиоксидантної системи у здорових та хворих осіб (1), що полягає у переліченні деяких механізмів токсичної дії метаболітів перекисного окислення ліпідів на структури біомембран та у стислому переліченні окремих компонентів системи антиоксидантного захисту.

Недоліком дослідження є те, що наведена інформація носить описовий та оглядовий характер та відсутня спроба дати інтегральну оцінку оксидантно-антиоксидантного балансу в цілому.

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб прогнозування адекватності програмного гемодіалізу у хворих на хронічну хворобу нирок V стадії, взятий нами за прототип (2), що включає визначення у сироватці крові вмісту церулоплазміну та трансферину, їх співвідношення, співставлення цього показника з аналогічним показником норми та подальшого розрахунку відповідного коефіцієнта за запропонованою авторами формулою для прогнозування адекватності програмного гемодіалізу у хворих, що досліджують.

Недоліком способу є те, що визначають та розраховують лише компоненти антиоксидантної системи, при цьому виразність процесів пероксидації не враховується. Крім того, спосіб має конкретно обмежену, а не універсальну спрямованість - визначення перелічених показників тільки у хворих на хронічну хворобу нирок V стадії. Відсутня також спроба дати інтегральну оцінку оксидантно-антиоксидантного балансу в цілому.

В основу корисної моделі поставлена задача удосконалити спосіб інтегральної оцінки оксидантно-антиоксидантного балансу у сироватці крові шляхом визначення у сироватці крові вмісту малонового діальдегіду як метаболіту кінцевого продукту перекисного окислення ліпідів та вмісту церулоплазміну, трансферину та сульфгідрильних груп як компонентів антиоксидантної системи та для більш вираженої інформативності та індивідуалізації дослідження введення математичного розрахунку співвідношення вмісту малонового діальдегіду хворого до вмісту малонового діальдегіду контролю (середнє значення) та поділ отриманої величини на суму співвідношень вмісту церулоплазміну, трансферину та сульфгідрильних груп хворого до їх аналогічних показників, контролю (середнє значення), поділеної на кількість доданків, і, якщо величина індексу оксидації дорівнює 1,0, це свідчить про збалансовану рівновагу між процесами пероксидації та системою антиоксидантного захисту, якщо величина індексу оксидації реєструється вищою за 1,0, це свідчить про порушення балансу оксидантних та антиоксидантних реакцій у бік надлишкового утворення ліпідних пероксидів та розвитку оксидативного стресу, що, в свою чергу, дозволить використовувати цей показник залежно від його кількісних величин для своєчасної діагностики дисбалансу оксидантних та антиоксидантних процесів, прогнозування на цій підставі перебігу хвороби та ефективності лікування патологічних станів.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб інтегральної оцінки оксидантно-антиоксидантного балансу у сироватці крові, що включає визначення у сироватці крові вмісту церулоплазміну та трансферину, додатково визначають вміст малонового діальдегіду і сульфгідрильних груп та розраховують інтегральний показник, що характеризує стан оксидантно-антиоксидантного балансу у сироватці крові - індекс оксидації, шляхом розрахунку співвідношення вмісту малонового діальдегіду хворого до вмісту малонового діальдегіду контролю (середнє значення) та поділення отриманої величини на суму співвідношень вмісту

церулоплазміну, трансферину та сульфгідрильних груп кожного хворого до їх аналогічних показників контролю (середні значення), поділеної на кількість доданків, і, якщо величина індексу оксидатії дорівнює 1,0, це свідчить про збалансовану рівновагу між процесами пероксидації та системою антиоксидантного захисту, якщо величина індексу оксидатії

реєструється вищою за 1,0, це свідчить про порушення балансу оксидантних та антиоксидантних реакцій у бік надлишкового утворення ліпідних пероксидів та розвитку оксидативного стресу.

Спосіб інтегральної оцінки оксидантно-антиоксидантного балансу у сироватці крові виконують наступним чином: у сироватці крові визначають вміст малонового діальдегіду: в пробірку беруть 0,5 мл сироватки крові (без ознак гемолізу) і додають 2,5 мл 0,025 М трис-гідрохлоридного буферу рН 7,4, витримують 30 хвилин та додають 1 мл 17 % розчину трихлороцтової кислоти, ретельно перемішують, проби центрифугують при 4000 об/хв. протягом 10 хв., відбирають 2 мл супернатанту і додають до них 1 мл 0,8 % розчину тіобарбітурової кислоти, прогривають у киплячій водяній бані протягом 10 хв. Інтенсивність забарвлення вимірюють на спектрофотометрі СФ-26 проти контролю на реактиви, у кюветах з довжиною оптичного шляху 10 мм при довжині хвилі 532 нм. Для проведення розрахунків використовують формулу:

$$C(\text{мкмоль/л}) = A_d \cdot 10^9 / 1,56 \cdot 10^5 \cdot 0,5,$$

де A_d - екстинція досліджуваного матеріалу, 10^9 - коефіцієнт перерахунку моль/л у мкмоль/л, $1,56 \cdot 10^5$ - коефіцієнт молярної екстинції, 0,5 - об'єм досліджуваного матеріалу. Або A_d перемножують на розрахункове число, яке дорівнює 12820;

- вміст церулоплазміну: в пробірку беруть 0,1 мл сироватки крові (без ознак гемолізу) і додають 8,0 мл 0,4 М ацетатного буферу рН 5,5 та 1,0 мл 0,5 % водного розчину р-фенілендіаміну солянокислого (субстрат), проби струшують та інкубують 60 хвилин при 37° С, після чого реакцію зупиняють додаванням 2,0 мл 3 % розчину фтористого натрію, перемішують та витримують у холодильнику протягом 30 хвилин при +4°С. Оптичну щільність інтенсивності забарвлення вимірюють на фотоелектроколориметрі при 530 нм у кюветах діаметром 10 мм проти контрольної проби, у яку розчини буферу та субстрату вносять після внесення розчину 3 % фтористого натрію та припинення реакції. Розрахунок показників здійснюють, помножуючи отримані дані абсорбції (Е) на коефіцієнт К (який дорівнює 0,875) та виражають величину концентрації церулоплазміну в г/л;

- вміст трансферину: в пробірку беруть 0,1 мл сироватки крові (без ознак гемолізу) і додають 1,0 мл 0,2 % розчину амоній-залізо (III) цитрат дегідроксидату (рН 5,5-5,8). Інтенсивність помутніння вимірюють проти контролю (замість 0,1 мл сироватки крові беруть 0,1 мл води) на фотоелектроколориметрі при 440 нм у кюветах діаметром 3 мм. Через 30 хвилин вимірювання повторюють (проби стоять при кімнатній температурі). Результати розраховують за різницею екстинцій дослідної та контрольної проби після 1-ї та 30-ї хвилини, яку помножують >на< 100 та виражають в умовних одиницях;

- вміст сульфгідрильних груп: у скляну пробірку на 20 мл беруть 0,1 мл сироватки крові, додають 1 мл дистильованої води, 1 мл 6М розчину калію йодиду, 3 краплі 5 % розчину крохмалю та 3,9 мл 0,1М фосфатного буферу рН 7,6 (загальний об'єм 6 мл), проби перемішують. Так само готують контрольну пробу, додаючи замість 0,1 мл сироватки крові 0,1 мл дистильованої води. Вимірюють оптичну щільність - досліджуваної проби за допомогою фотоелектроколориметра КФК-3 в кюветі з товщиною шару 20 мм проти дистильованої води, довжина хвилі 500 нм. Потім в пробу вносять 0,3 мл 0,001Н розчину молекулярного йоду, ретельно струшують і колориметрують рівно через 10 секунд після внесення йоду, час контролюють секундоміром. Контроль колориметрують аналогічно. Кількість сульфгідрильних груп (SH- груп) визначають за кількістю йоду (в еквівалентах), який взаємодіяв з тіогрупами. Розрахунок проводять за формулою:

$$X = 0,3 \cdot (E_k - E_d) / E_k,$$

де X - кількість SH- груп (мкмоль); 0,3 - кількість йоду, що вноситься в пробу (мікроеквіваленти), E_k та E_d - екстинції контролю та досліджуваної проби;

- розрахунок індексу оксидатії (IO) - інтегрального показника, що характеризує стан оксидантно-антиоксидантного балансу, шляхом розрахунку співвідношення вмісту у сироватці крові малонового діальдегіду хворого до вмісту малонового діальдегіду контролю (середнє значення) та поділення отриманої величини на суму співвідношень вмісту церулоплазміну, трансферину та сульфгідрильних груп хворого до їх аналогічних показників контролю (середні значення), поділеної на кількість доданків, за формулою:

$$IO = MDA_x / MDA_k : [(ЦП_x / ЦП_k + Тр_x / Тр_k + SH_x / SH_k) : 3],$$

де IO - індекс оксидатії; MDA_x - вміст малонового діальдегіду у хворого; MDA_k - вміст малонового діальдегіду контролю (середнє значення); $ЦП_x$ - вміст церулоплазміну у хворого; $ЦП_k$ - вміст церулоплазміну контролю (середнє значення); Tr_x - вміст трансферину у хворого; Tr_k - вміст трансферину контролю (середнє значення); SH_x - вміст сульфгідрильних груп у хворого; SH_k - вміст сульфгідрильних груп контролю (середнє значення); 3 - кількість доданків.

Необхідність визначення та використання у чисельнику запропонованої формули розрахунку інтегрального індексу оксидатії (IO) вмісту малонового діальдегіду у сироватці крові викликана тим, що саме малоновий діальдегід є кінцевим продуктом процесу перекисного окислення ліпідів, частка якого складає 40 % від усіх його метаболітів, тобто вміст малонового діальдегіду найбільш повно та інформативно відбиває процеси перекисного окислення ліпідів у даному середовищі (біологічній рідині): Визначення та використання у знаменнику формули показників вмісту церулоплазміну, трансферину та сульфгідрильних груп обумовлена тим, що перелічені показники є представниками різних ланок універсальної системи антирадикального захисту та у сумі дають узагальнюючу відповідь цієї системи на реакцію перекисидатії в цілому. Урахування ж загальної відповіді системи антиоксидантного захисту на накопичення пероксидів у сироватці крові з обчисленням кількості доданків слугує для більш вираженої об'єктивізації способу, тобто надає отриманим результатам більшій інформативності в інтегральній оцінці оксидантно-антиоксидантного балансу у сироватці крові.

Апробація способу, що заявляється, проведена у відділі нефрології та діалізу та відділі еферентних технологій і лабораторії біохімії, ДУ "Інститут нефрології НАМН України" у 30 практично здорових осіб віком від 18 до 57 років з нормальними аналізами крові та сечі та без захворювань нирок в анамнезі (група контролю), а також у 119 хворих того ж віку із верифікованим діагнозом - хронічна хвороба нирок (I-V стадії).

Отримані результати показали, що в сироватці крові групи контролю вміст малонового діальдегіду за середніми значеннями становив 119 ± 35 мкмоль/л, вміст церулоплазміну - $0,218 \pm 0,011$ г/л, вміст трансферину - $5,0 \pm 1,0$ ум. од., вміст сульфгідрильних груп - $2,22 \pm 0,02$ ммоль/л, розрахунок індексу оксидатії (10) за запропонованим способом дорівнює 1,0.

Точність способу, тобто помилка у двох паралельних визначеннях, не перевищує $\pm 5,9$ %.

Наводимо приклади практичного застосування способу.

Приклад 1. Хвора П., 24 роки, тематична карта № 294. Звернулася зі скаргами на дизурію та періодичний біль у надлобковій ділянці. Хворіє з 16 років, впродовж останніх двох років рецидиви кожні 2-3 тижні. Загальний аналіз крові: $L - 6,5 \times 10^9$ /л; ШОЕ-12 мм/год.; С-реактивний протеїн - 10,9. Загальний аналіз сечі: непрозора, білок - 0,09 г/л; $L - 15-20$ у п/з; бактерії - багато. Бактеріологічне дослідження сечі: $E. coli \times 10^6$ КУО/мл. Клінічний діагноз: Хронічна хвороба нирок I ст.: неускладнений пієлонефрит, рецидивуючий перебіг. При застосуванні способу, що заявляється, виявлено, що в сироватці крові вміст малонового діальдегіду становив 229,0 мкмоль/л (119 ± 35 у контролі), вміст церулоплазміну - 0,191 г/л ($0,218 \pm 0,011$ у контролі), вміст трансферину - 5,27 ум. од. ($5,0 \pm 1,0$ у контролі), вміст сульфгідрильних груп - 2,27 ммоль/л ($2,22 \pm 0,02$ у контролі). Застосування запропонованого способу показало, що індекс оксидатії дорівнює 1,96, що свідчить про порушення у цієї хворої у сироватці крові балансу оксидантних та антиоксидантних реакцій у бік надлишкового утворення ліпідних пероксидів приблизно у 2 рази та про необхідність проведення відповідної корекції терапевтичних заходів.

Приклад 2. Хвора С, 50 років, а. к. № 148. Клінічний діагноз: хронічна хвороба нирок V стадії, гломерулонефрит, пролонгований сеансами програмного гемодіалізу з 23.06.2006 р. Ренопаренхімна артеріальна гіпертензія. Вторинна анемія. Солітарна кіста лівої нирки. Індекс коморбідності = 3 бали (хронічна хвороба нирок - 2 бали, вік - 1 бал). АТ 130-150/70-80 мм рт. ст. Хронічну хворобу нирок встановлено в 2004 р., переносимість гемодіалізу задовільна, К t/v 1,22. Аналіз крові: гемоглобін 73 г/л (N 130-160), еритроцити $2,4 \times 10^{12}$ /л (N 4,0-5,0), к. п. 0,91; ШОЕ 56 мм/год. (N 2-15); сечовина 24,8 ммоль/л (N 3,8-7,3), креатинін 1,0 ммоль/л (N 0,04-0,11), загальний білок 56,0 г/л (N 66-87), альбумін 43,1 г/л (N 35-50). Добовий діурез 400 мл, білок сечі 1,18 г, питома вага до 1,006. При застосуванні способу, що заявляється, виявлено, що в сироватці крові вміст малонового діальдегіду становив 713,0 мкмоль/л (119 ± 35 у контролі), вміст церулоплазміну - 0,228 г/л ($0,218 \pm 0,011$ у контролі), вміст трансферину - 2,9 ум. од. ($5 \pm 1,0$ у контролі), вміст сульфгідрильних груп - 1,75 ммоль/л ($2,22 \pm 0,02$ у контролі). Застосування запропонованого способу показало, що індекс оксидатії дорівнює 7,4, що свідчить про порушення балансу оксидантних та антиоксидантних реакцій у бік надлишкового утворення ліпідних пероксидів приблизно у 7,5 рази, розвитку оксидативного стресу та про необхідність перегляду лікування, що застосовують у цієї хворої (призначення антиоксидантів тощо).

З наведених прикладів видно, що у обстежених пацієнтів вміст малонового діальдегіду характеризує стан процесів ліпопероксидації у сироватці крові, а кожний із компонентів антиоксидантної системи характеризує стан антиоксидантної відповіді на накопичення пероксидів у цій біологічній рідині, але тільки застосування способу, що заявляється, дозволяє виявити взаємозв'язок між процесами перекисного окислення ліпідів та антиоксидантного захисту, тобто дати об'єктивну оцінку оксидантно-антиоксидантного балансу у сироватці крові кожного хворого.

Отже, суттєвою перевагою способу, що заявляється, є застосування визначення індексу оксидзації - інтегрального показника, що характеризує стан оксидантно-антиоксидантного балансу у сироватці крові, який об'єктивно відбиває взаємозв'язок між процесами пероксидації та антиоксидантною відповіддю індивідуально у кожного пацієнта, тобто об'єктивно інформує про стан оксидантно-антиоксидантного балансу у сироватці крові конкретного хворого. До переваг способу також належить доступність устаткування та необхідних реактивів вітчизняного виробництва, що сприяє можливості його використання у будь-якій клініко-діагностичній лабораторії.

Спосіб, що заявляється, може бути використаним у дітей та дорослих в умовах клініки, а також в експериментальних дослідженнях для оцінки перебігу та прогнозу хвороби, ефективності як медикаментозного так і оперативного лікування шляхом оцінки метаболічних зрушень та ефективності їх корекції. Використання відносного показника усуває залежність кінцевого результату показників, що досліджувалися, від метода та умов визначення, одиниць виміру тощо. Крім того, в рамках стандартизації (уніфікації) лабораторного процесу використання відносних одиниць надає можливість співставлення результатів досліджень, які отримують в різних лабораторіях, їх клінічної оцінки та можливості використання при ретроспективному аналізі отриманих раніше даних.

Таким чином, спосіб інтегральної оцінки оксидантно-антиоксидантного балансу у сироватці крові є доступним, інформативним, нескладним у виконанні, необтяжливим для хворого, потребує невеликої кількості біологічного матеріалу, дає об'єктивну оцінку отриманих результатів за рахунок обчислення інтегрального індексу оксидзації у відносних одиницях, дозволяє підвищити точність діагностики, коефіцієнт варіабельності способу не перевищує $\pm 5,9\%$.

Джерела інформації:

1. Тугушева Ф.А. Процессы перекисного окисления липидов и защитная роль антиоксидантной системы в норме и у больных с хроническим гломерулонефритом /Ф.А. Тугушева // Нефрология.- 2001.- Т. 5, № 1.- С. 19-27.

2. Пат. № 62757, UA, МПК G01N 33/49 (2006.01). Спосіб прогнозування адекватності програмного гемодіалізу у хворих на хронічну хворобу нирок V стадії / І.О. Дудар, Л.В. Король, Л.Я. Мигаль, Ю.І. Гончар; ДУ "ІНАМНУ"; № u2011 02786, 10.03.2011; Опубл. 12.09. 2011, Бюл. № 17. - 5 с. (прототип).

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб інтегральної оцінки оксидантно-антиоксидантного балансу у сироватці крові, що включає визначення у сироватці крові вмісту церулоплазміну та трансферину, який **відрізняється** тим, що додатково визначають вміст малонового діальдегіду і сульфгідрильних груп та розраховують інтегральний показник, що характеризує стан оксидантно-антиоксидантного балансу у сироватці крові - індекс оксидзації, шляхом розрахунку співвідношення вмісту малонового діальдегіду хворого до вмісту малонового діальдегіду контролю (середнє значення) та поділ отриманої величини на суму співвідношень вмісту, церулоплазміну, трансферину та сульфгідрильних груп кожного хворого до їх аналогічних показників контролю (середні значення), поділеної на кількість доданків, і, якщо величина індексу оксидзації дорівнює 1,0, це свідчить про збалансовану рівновагу між процесами пероксидації та системою антиоксидантного захисту, якщо величина індексу оксидзації реєструється вищою за 1,0, це свідчить про порушення балансу оксидантних та антиоксидантних реакцій у бік надлишкового утворення ліпідних пероксидів та розвитку оксидативного стресу.

Комп'ютерна верстка Л.Литвиненко

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