



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **76917**

(13) **U**

(51) МПК

G01N 33/48 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2012 07005**

(22) Дата подання заявки: **08.06.2012**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **25.01.2013**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **25.01.2013, Бюл.№ 2**

(72) Винахідник(и):

**Король Леся Вікторівна (UA),
Мигаль Людмила Якимівна (UA)**

(73) Власник(и):

**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ
НЕФРОЛОГІЇ АМН УКРАЇНИ",
вул. Дегтярівська, 17-в, м. Київ, 04050 (UA)**

(54) СПОСІБ ІНТЕГРАЛЬНОЇ ОЦІНКИ РІВНОВАГИ ОКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНИХ ПРОЦЕСІВ У ЕРИТРОЦИТАХ

(57) Реферат:

Спосіб інтегральної оцінки рівноваги оксидантно-антиоксидантних процесів у еритроцитах включає визначення у еритроцитах вмісту малонового діальдегіду, загальної пероксидазної активності та розраховують інтегральний показник, що характеризує стан рівноваги оксидантно-антиоксидантних процесів у еритроцитах.

UA 76917 U

Корисна модель належить до галузі медицини, зокрема до лабораторної діагностики, і може бути використана для інтегральної оцінки рівноваги окисдантно-антиоксидантних процесів у еритроцитах як в умовах експерименту, так і в умовах клініки у хворих будь-яких вікових груп, визначення на цій підставі виразності оксидативного стресу, прогнозування перебігу патологічних станів та ефективності їх лікування.

Останнім часом все більше уваги надається важливій ролі перекисного окислення ліпідів у розвитку різних патологічних станів. Вільнорадикальне окислення, частиною якого є перекисне окислення ліпідів, - природний метаболічний процес, що перебігає в усіх органах та тканинах та забезпечує поновлення складу ліпідів біомембран, активність мембранних ліпідозалежних ферментів, окисне фосфорилування в мітохондріях тощо. У фізіологічних умовах кисневий гомеостаз підтримується за рахунок збалансованості оксигеназних та оксидазних реакцій, рівноваги між швидкістю перекисного окислення ліпідів та активністю антиоксидантної системи захисту. Надлишок утворення активних форм кисню завдяки значній цитотоксичній дії може бути причиною ушкодження та загибелі клітин. Як відомо, підсилення процесів перекисного окислення ліпідів внаслідок порушення рівноваги в системі "оксиданти-антиоксиданти" є неспецифічним процесом та має місце при різних патологічних станах. Найбільш зручною та доступною моделлю щодо вивчення стану ліпідної пероксидації є еритроцит, стан якого адекватно відбиває метаболічні процеси, що діють в інших клітинах організму. На сьогодні є актуальним пошук єдиного інтегрального показника для оцінки порушення оксидантно-антиоксидантної рівноваги в еритроцитах як міри метаболічної відповіді клітин організму на патологічний процес та виразності оксидативного стресу.

Відомий спосіб інтегральної оцінки оксидантно-антиоксидантного балансу у сироватці крові (1), що полягає у визначенні вмісту малонового діальдегіду, церулоплазміну, трансферину та тіолових груп і розрахунку індексу оксидації сироватки крові шляхом подальших математичних дій з урахуванням середніх даних аналогічних показників норми.

Недоліком способу є те, що даний спосіб дає можливість дати інтегральну оцінку оксидантно-антиоксидантної рівноваги тільки у сироватці крові, яка належить до позаклітинного простору.

Найбільш близьким аналогом до способу, що заявляється, є спосіб вивчення процесів перекисного окислення ліпідів у еритроцитах (2), що полягає у визначенні вмісту дієнових кон'югатів та малонового діальдегіду, що є компонентами перекисного окислення ліпідів.

Недоліком способу є те, що визначають та розраховують лише окремі компоненти перекисного окислення ліпідів, які відносяться до первинних та вторинних його продуктів.

В основу корисної моделі поставлена задача удосконалити спосіб інтегральної оцінки рівноваги оксидантно-антиоксидантних процесів у еритроцитах шляхом визначення у еритроцитах вмісту малонового діальдегіду як метаболіту кінцевого продукту перекисного окислення ліпідів та загальної пероксидазної активності як компоненту антиоксидантної системи і для більш вираженої інформативності та індивідуалізації дослідження введення математичного розрахунку співвідношення вмісту малонового діальдегіду хворого до вмісту малонового діальдегіду контролю (середнє значення) та поділення отриманої величини на співвідношення показників загальної пероксидазної активності хворого до загальної пероксидазної активності контролю (середнє значення) - індексу оксидації, що, в свою чергу, дозволить використати цей показник залежно від його кількісних величин для своєчасної діагностики ступеня виразності оксидативного стресу, для оцінки на цій підставі перебігу та прогнозу хвороби, ефективності лікувальних заходів тощо.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб інтегральної оцінки рівноваги оксидантно-антиоксидантних процесів у еритроцитах, який включає визначення у еритроцитах вмісту малонового діальдегіду, згідно з винаходом, додатково визначають загальну пероксидазну активність та розраховують інтегральний показник, що характеризує стан рівноваги оксидантно-антиоксидантних процесів у еритроцитах - індекс оксидації, який полягає у розрахунку співвідношення вмісту малонового діальдегіду хворого до вмісту малонового діальдегіду контролю (середнє значення) та поділення отриманої величини на співвідношення загальної пероксидазної активності хворого до загальної пероксидазної активності контролю (середнє значення), і, якщо величина індексу оксидації дорівнює 1,0, що свідчить про збалансовану рівновагу між процесами пероксидації та антиоксидантного захисту, якщо величину індексу оксидації реєструють 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 рівноваги окисдантно-антиоксидантних процесів у еритроцитах виконують наступним чином:

підготовка біоматеріалу - для визначення вмісту малонового діальдегіду та загальної пероксидазної активності використовують еритромасу, яку отримують шляхом забирання крові з антикоагулянтами (цитрат 1:9 чи гепарин), плазму відбирають, а еритромасу тричі відмивають ізотонічним розчином хлориду натрію;

визначення вмісту малонового діальдегіду: в центрифужну пробірку відбирають 0,5 мл суспензії еритроцитів (попередньо тричі відмитих ізотонічним розчином) 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 3000 об/хв протягом 10 хвилин. Відбирають 2 мл супернатанту і додають 1 мл 0,8 % розчину тіобарбітурової кислоти. Прогрівають у киплячій водянній бані протягом 10 хвилин. 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 досліджу, 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 і перемножують на розрахункове число, яке дорівнює 12820;

визначення загальної пероксидазної активності починають з приготування гемолізату еритроцитів 1:1000: лабораторним дозатором відбирають 0,02 мл відмитих і щільно упакованих еритроцитів і розчиняють у 20 мл дистильованої воли, потім у скляні пробірки з дослідною і контрольною пробами вносять 1 мл 0,2 М ацетатного буфера рН 4,9 і 1 мл 0,0005 М розчину індигокарміну, додають 0,5 мл гемолізату еритроцитів, пробірки струшують і ставлять на 5 хв у водяну баню при 30 °С. Після інкубації у дослідну пробірку додають 0,5 мл 0,03 М розчину пероксиду водню, енергійно струшують і одразу ж вмикають секундомір, рівно через 2 хв зупиняють реакцію додаванням 3 мл 20 % розчину сірчаної кислоти. В контрольну пробу замість пероксиду водню вносять дистильовану воду. Інтенсивність забарвлення дослідної і контрольної проб вимірюють на фоторелектроколориметрі КФК-3 проти дистильованої води у кюветах з довжиною оптичного шляху 10 мм при довжині хвилі 670 нм. Загальну пероксидазну активність (А) виражають у міжнародних одиницях за формулою Веберта та Рихтериха:

$$A = \Delta E \times 10^6 \times EV/AV \times \varepsilon \times d \times T = \Delta E \times 571,428 \text{ мкмоль/хв} \times \text{л, або}$$

$$A = \Delta E \times 571,428 / 0,14 \text{ мкмоль/хв} / 1 \text{ г Hb},$$

де ΔE - різниця між контролем та дослідом, ε - коефіцієнт молярної екстинції індигокарміну, d - товщина кювети, T - час реакції, EV - кінцевий об'єм реакційної суміші, AV - початковий об'єм реакційної суміші, 0,14 - перерахунок на 1г гемоглобіну (Hb);

розрахунок індексу оксидатії, інтегрального показника, що характеризує стан окисдантно-антиоксидантної рівноваги, проводять розрахунком співвідношення вмісту в еритроцитах малонового діальдегіду хворого до вмісту малонового діальдегіду контролю (середнє значення) та поділення отриманої величини на співвідношення загальної пероксидазної активності хворого до загальної пероксидазної активності контролю (середнє значення), за формулою:

$$IO = MDA_x / MDA_k : ZPA_x / ZPA_k,$$

де: IO - індекс оксидатії; MDA_x - вміст малонового діальдегіду у хворого; MDA_k - вміст малонового діальдегіду контролю (середнє значення); ZPA_x - загальна пероксидазна активність хворого; ZPA_k - загальна пероксидазна активність контролю (середнє значення).

Необхідність визначення та використання у чисельнику запропонованої формули індексу оксидатії вмісту малонового діальдегіду у еритроцитах 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 (біологічному матеріалі). Визначення та використання у знаменнику формули показника загальної пероксидантної активності обумовлена тим, що саме цей показник є представником ферментативної ланки та клітинним компонентом універсальної системи антирадикального захисту, що дає узагальнюючу відповідь цієї системи на внутрішньоклітинні процеси пероксидації в цілому. Урахування ж загальної відповіді системи антиоксидантного захисту на накопичення пероксидів у клітинах доцільно використовувати для більш вираженої об'єктивізації способу, що заявляється, тобто надає отриманим результатам більшої інформативності в інтегральній оцінці рівноваги окисдантно-антиоксидантних процесів у еритроцитах.

Апробація способу, що заявляється, проведена у лабораторії біохімії, у відділі нефрології та діалізу та у відділі еферентних технологій 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).

Як свідчать результати досліджень, в еритроцитах групи контролю вміст малонового діальдегіду за середніми значеннями становить $549,0 \pm 51,0$ мкмоль/л, загальна пероксидазна активність - $457,0 \pm 20,0$ мкмоль/хв /1г Hb. Індекс окисації в групі контролю дорівнює 1,0. Точність способу, тобто помилка у двох паралельних визначеннях, не перевищує $\pm 6,1$ %.

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 еритроцитах вміст малонового діальдегіду становить $645,0$ мкмоль/л ($549,0 \pm 51,0$ у контролі), загальна пероксидазна активність - $373,0$ мкмоль/хв /1г Hb ($457,0 \pm 20,0$ у контролі). Застосування запропонованого способу показало, що індекс окисації дорівнює 1,4, що свідчить про порушення у еритроцитах цієї хворої рівноваги окисантно-антиоксидантних процесів у бік надлишкового утворення ліпідних пероксидів приблизно у 1,5 рази та про необхідність проведення відповідної корекції лікування.

Приклад 2. Хвора С., 50 років, а.к. № 148. Клінічний діагноз: хронічна хвороба нирок V ст., 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 еритроцитах вміст малонового діальдегіду становить $797,0$ мкмоль/л ($549,0 \pm 51,0$ у контролі), загальна пероксидазна активність - $309,0$ мкмоль/хв /1г Hb ($457,0 \pm 20,0$ у контролі), індекс окисації дорівнює 2,2, що свідчить про порушення у еритроцитах цієї хворої рівноваги окисантно-антиоксидантних процесів у бік надлишкового утворення ліпідних пероксидів більш, ніж у 2 рази, розвиток оксидативного стресу та про необхідність корекції лікувальних заходів (призначення антиоксидантів тощо).

З наведених прикладів видно, що у обстежених пацієнтів вміст малонового діальдегіду характеризує стан процесів ліпопероксидації у еритроцитах, а загальна пероксидазна активність як клітинний компонент антиоксидантної системи характеризує стан антиоксидантної відповіді на накопичення пероксидів у цьому біологічному середовищі, але тільки застосування способу, що заявляється, дозволяє виявити взаємозв'язок між процесами перекисного окислення ліпідів та антиоксидантного захисту, тобто дати об'єктивну оцінку рівноваги окисантно-антиоксидантних процесів у еритроцитах як зручної та доступної моделі внутрішньоклітинного метаболізму індивідуально у кожного хворого.

Отже, суттєвою перевагою способу, що заявляється, є застосування визначення індексу окисації - інтегрального показника, що характеризує стан рівноваги окисантно-антиоксидантних процесів у еритроцитах, який об'єктивно відбиває взаємозв'язок між процесами пероксидації та антиоксидантною відповіддю індивідуально у кожного пацієнта, тобто об'єктивно інформує про стан рівноваги окисантно-антиоксидантних процесів у еритроцитах конкретного хворого. Використання відносного показника усуває залежність кінцевого результату показників, що досліджуються, від методів та умов визначення, одиниць виміру тощо; використання відносних одиниць в рамках стандартизації (уніфікації) лабораторного процесу надає можливість співставлення результатів досліджень, які отримують в різних лабораторіях, їх клінічної оцінки та можливості використання при ретроспективному аналізі отриманих раніше даних; доступність необхідного устаткування та реактивів вітчизняного виробництва, що дозволяє використовувати його у будь-якій клініко-діагностичній лабораторії.

Таким чином, спосіб інтегральної оцінки рівноваги окисантно-антиоксидантних процесів у еритроцитах є нетрудомістким, доступним, дозволяє максимально скоротити процедуру отримання необхідної інформації про стан внутрішньоклітинних метаболічних зрушень, дає об'єктивну оцінку отриманих результатів за рахунок обчислення інтегрального індексу окисації

у відносних одиницях і може бути використаним для оцінки перебігу та прогнозу хвороби як у дітей та дорослих в умовах клініки, так і в експериментальних дослідженнях, а також ефективності як медикаментозного, так і оперативного лікування за рахунок оцінки метаболічних зрушень та ефективності їх корекції, точність діагностики: коефіцієнт варіабельності способу не перевищує $\pm 6,1\%$.

Джерела інформації:

1. Заявка № а 201205647, UA, МПК (2011.01) G01 N 33/48. Спосіб інтегральної оцінки оксидантно-антиоксидантного балансу у сироватці крові / Л.В. Король, Л.Я. Мигаль; ДУ ЧН НАМНУ; № а 201205647 від 08.05.2012.

2. Асимова М.У. Перекисное окисления липидов на мембране эритроцитов у больных детей острой дизентерией Флекснер / М.У. Асимова // Проблемы медицинской энзимологии. Современные технологии лабораторной диагностики нового столетия: Труды Всероссийской конф., 28-31 мая 2002 г. - М., "Авиа-издат", 2002. - С. 23-24.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб інтегральної оцінки рівноваги оксидантно-антиоксидантних процесів у еритроцитах, який включає визначення у еритроцитах вмісту малонового діальдегіду, який **відрізняється** тим, що додатково визначають загальну пероксидазну активність та розраховують інтегральний показник, що характеризує стан рівноваги оксидантно-антиоксидантних процесів у еритроцитах - індекс оксидації, який полягає у розрахунку співвідношення вмісту малонового діальдегіду хворого до вмісту малонового діальдегіду контролю (середнє значення) та поділення отриманої величини на співвідношення загальної пероксидазної активності хворого до загальної пероксидазної активності контролю (середнє значення), і якщо величина індексу оксидації дорівнює 1,0, це свідчить про збалансовану рівновагу між процесами пероксидації та антиоксидантного захисту, якщо величину індексу оксидації реєструють 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 М. Ломалова

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