



УКРАЇНА

(19) UA (11) 38569 (13) A

(51) 7 G01N33/84, G01N21/76

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИОКСИДАНТНОЇ СТІЙКОСТІ БІОЛОГІЧНОГО СУБСТРАТУ

(21) 2000074515

(22) 27.07.2000

(24) 15.05.2001

(33) UA

(46) 15.05.2001, Бюл. № 4, 2001 р.

(72) Афоніна Галина Борисівна, Сорокіна Інна Олександрівна, Харитончук Олена Леонідівна, Колесова Наталія Валентинівна, Глуценко Алла Володимирівна, Теслюк Ігор Іванович, Яворовська Олена Олександрівна

(73) Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця

(57) Спосіб визначення антиоксидантної стійкості біологічного субстрату шляхом дослідження його

окислення, який **відрізняється** тим, що досліджують кінетичні параметри хемілюмінесценції, ініційованої гідроген пероксидом, і антиоксидантну стійкість визначають за формулою:

$$AOC = \frac{1 \cdot \operatorname{tg} \alpha}{\sum XJ} \cdot 100,$$

де: tg кута альфа - десятичне значення тангенса кута нахилу кривої хемілюмінесценції між показниками 1-ої і 4-ї хвилинами вимірювання; $\sum XJ$ - світлосума світіння проби за весь період вимірювання в імп/сек.

Винахід відноситься до медицини, а саме до імунологічних методів дослідження, і може застосовуватися в лікувально-профілактичних і науково-дослідних закладах для визначення антиоксидантної стійкості (АОС) в клітинах, в крові, слині, сечі та інших біологічних субстратах, а також в системах *in vitro* при випробуванні антиоксидантної дії різних препаратів.

Визначення АОС біологічного субстрату широко використовується в біології та медицині з діагностичною та прогностичною метою. Це дослідження проводять хворим при дії активаторів вільнорадикального окислення (ксенобіотики, лікарські препарати, іонізуюча радіація та ін.), в системах *in vitro* та *in vivo*, при старінні, розвитку запалення, пухлинному рості і багатьох інших фізіологічних та патологічних процесах в організмі. Відомі способи визначення АОС базуються на непрямих вимірах показника і заключаються, головним чином, в визначенні вторинних, побічних або кінцевих продуктів окислення, тому не дозволяють контролювати загальну АОС біологічного субстрату та мають низьку точність. Це знижує інформативність отриманих даних, знижує їхню діагностичну, прогностичну цінність і обґрунтовує необхідність створення більш точного способу визначення АОС біологічного субстрату.

Так, відомі непрямі способи визначення АОС стійкості біологічного субстрату шляхом дослідження вмісту в ньому кінцевих, побічних та вторинних продуктів перекисного окислення ліпідів, окислених форм ДНК (оксі-ДНК, шифрові основи,

дієнові кон'югати, газоподібні продукти та ін.), з наступним порівнянням показників зі значенням норми, які одержані в групі здорових осіб [1]. Однак, ці способи напівкількісні, непрямо відображають АОС окремих класів молекул, не дозволяють прямо виміряти показник н біологічному субстраті, трудомікі, багатоетапні, що знижує точність визначення АОС [2].

Найбільш близьким до технічного вирішення являється спосіб оцінки АОС біологічного субстрату шляхом визначення його окислення при інкубації з високоокислювальною системою жовткових ліпопротеїдів та наступною кількісною оцінкою концентрації малонового діальдегіда (МДА), який утворюється в реакції [3]. Чим менше МДА утворилось, в порівнянні з контролем, тим вище АОС біологічного субстрату. В цьому способі, на відміну від інших, використовується чутлива до антиоксидантної дії система жовтчастих ліпопротеїдів, а також окислювач, котрий ініціює реакцію, та біологічний субстрат, котрий її гальмує. Шляхом визначення величини зниження вмісту МДА після додавання біологічного субстрату оцінюють його АОС. Однак, таке дослідження багатоетапне, потребує використання додаткового важкостандартизованого біологічного компонента - жовтчастих ліпопротеїдів, а також базується на визначенні вторинних продуктів - МДА. Ці продукти відображають рівень окислення тільки ліпідних молекул, але не ферментів, білків-хелаторів і ДНК [3]. Окрім того, цей спосіб не враховує дії гідрофільних антиоксидантів, тому не дозволяє виявити загальну антиоксидантну стійкість

досліджуваних об'єктів, що знижує точність дослідження АОС, зважає інформативність отриманих даних і їхнє використання з діагностичними та прогностичними цілями.

В основі нашого винаходу поставлена задача створити спосіб, який дозволяє підвищити точність визначення АОС клітин і тканин організму шляхом прямого кількісного автоматизованого вимірювання інтегрального показника АОС, котрий відображає стан як гідрофільних так і гідрофобних антиоксидантів в досліджуваному субстраті. Це можливо при оцінці кінетики хемілюмінесценції біологічного субстрату - принципово іншого біологічного параметра, ніж продукти окислювальної реакції, які визначалися в відомих раніше способах. Метод хемілюмінесценції відрізняється високою чутливістю, в порівнянні з біохімічними методами, які використані в прототипі, та дозволяє виявляти продукти реакції в концентрації 10^{-8} М/мл, на декілька порядків вище, ніж в відомих способах. Кінетика хемілюмінесценції біологічного субстрату прямо відображає інтегральний внесок різних антиоксидантів в розвиток реакції на ранніх і пізніх етапах, дозволяє виявляти варіанти поетапних змін АОС та стандартизувати їх, розробити на основі цих параметрів уніфіковану формулу для визначення АОС.

Технічним результатом такого вирішення є підвищення точності, автоматизація і скорочення етапів визначення АОС біологічного субстрату, що значно підвищує ефективність діагностики та прогнозування багатьох патологічних процесів в організмі, об'єктивізує розробку показників до використання антиоксидантів і оцінку ефективності їхньої дії.

Завдання досягається тим, що в відомому способі визначення антиоксидантної стійкості біологічного субстрату досліджують його окислення, а згідно винаходу, в способі досліджують кінетичні параметри хемілюмінесценції, ініційованої гідроген пероксидом, і антиоксидантну стійкість визначають за формулою:

$$AOC = \frac{1 \cdot \operatorname{tg} \alpha}{\sum X_{II}} \cdot 100,$$

де: tg кута альфа - десятинне значення тангенса кута нахилу кривої хемілюмінесценції між показниками 1-ої і 4-ї хвилинами вимірювання; $\sum X_{II}$ - світлосума світіння проби за весь період вимірювання в імп/сек.

Відмінними особливостями способу оцінки показника АОС біологічного субстрату, фактично є використання кінетичних параметрів хемілюмінесценції, об'єднаних в формулі, котра дозволяє прямо кількісно визначити інтегральну АОС в конкретній пробі. Технічне рішення підвищує точність, автоматизує і зменшує кількість етапів дослідження.

Принципово новим в технічному рішенні є облік інтегрального внеску гідрофільних і гідрофобних антиоксидантів в загальний показник АОС біологічного субстрату, що підвищує точність та інформативність дослідження, в порівнянні з відомими способами.

Таким чином, порівняння способу з прототипом дозволяє встановити його відповідність критерію «новизна», оскільки вперше проводиться визначення АОС біологічного субстрату з врахуванням комплексу кінетичних параметрів хемілюміне-

сценції - кута нахилу кривої світіння між першим і другим спалахами, а також показника загальної світлосуми світіння, що дозволяє врахувати участь різних антиоксидантних компонентів, які гальмують утворення активних кисневих метаболітів на всіх етапах ланцюга вільнорадикальних реакцій в досліджуваному біологічному субстраті.

Стосовно дотримання критерію «суттєві відмінності» можна сказати, що спосіб суттєво підвищує точність та інформативність оцінки АОС біологічного об'єкту: передбачає можливість визначення її в динаміці, а також ґрунтується на використанні найбільш адекватних задач, прямих, автоматизованих високочутливих методів вимірювання.

За даними літератури такі способи визначення АОС невідомі.

Спосіб здійснюється наступним чином. Досліджувальний біологічний субстрат - зразок сироватки крові, слини, клітин в кількості 0,2 мл (або 2 млн. клітин в 0,2 мл фізіологічного розчину) вносять в кювету хемілюмінометра з 1,8 мл розчину Хенкса без індикатора, рН 7,2, інкубують в темряві 5 хвилин при 37°C, визначають фон спонтанного світіння, потім додають до проби 0,3 мл 1,5% розчину гідроген пероксиду і вимірюють кінетику хемілюмінесценції за 60 циклів при нижньому рівні 1 mV. Показник антиоксидантної стійкості (АОС) роз-

раховують за формулою: $AOC = \frac{1 \cdot \operatorname{tg} \alpha}{\sum X_{II}} \cdot 100,$

де: tg кута альфа - десятинне значення тангенса кута нахилу кривої хемілюмінесценції між показниками 1-ої і 4-ї хвилинами вимірювання; $\sum X_{II}$ - світлосума світіння проби за весь період вимірювання в імп/сек.

Конкретний приклад:

Визначали АОС сироватки крові хворої М.Г.К-ко з діагнозом: ішемічна хвороба серця. Стабільна стенокардія II-III-го функціонального класу. ХНК-I. Коронарний кардіосклероз.

Кров забирали у пацієнтки в кількості 1 мл з кубітальної вени натщесерце, сироватку відділяли шляхом центрифугування і вносили в кювети хемілюмінометра (ХЛМ1Ц-01 вир-ва з-ду ім. Королева) в кількості 0,2 мл з 1,8 мл розчину Хенкса без індикатора. Після 5 хвилин інкубації в біостаті хемілюмінометра при 37°C встановлювали нижній рівень вимірів 1 мВ і вимірювали спонтанне світіння проби за 10 секунд в режимі віднімання фона установки. Підраховували середнє значення показника, котре було 14 імп/сек. Потім в пробу вносили 0,3 мл 1,5% розчину гідроген пероксиду та виміряли кінетичні параметри хемілюмінесценції за 60 циклів. Підраховували інтегральний показник світлосуми світіння проби - $\sum X_{II}$ (56,4 імп/сек) і показники хемілюмінесценції за 1-у і 4-у хвилини вимірів в імп/сек. Визначали транспортом кут нахилу кривої, яка з'єднує середні значення показників світіння проби на 1-ій (30,7 імп/сек) і 4-ій хвилинах (3,5 імп/сек) вимірювання та за таблицею логарифмів підраховували десятинне значення тангенса кута (53°), яке було 1,327. Отримані значення підставляли в формулу: $1 \times 1,327 \times 100 / 56,4 = 2,4$.

Підраховували показник АОС, котрий був 2,4 при значеннях контролю 6 від. од., що свідчить про зниження АОС в 2,5 рази, в зрівнянні з нормою.

Час вимірювання - 15 хвилин. Зниження АОС сироватки крові є поганим прогностичним показником і вимагає в даному випадку призначення лікувального курсу антиоксидантів. Після проведення курсу лікування терміном 17 діб, показник АОС в сироватці крові хворої підвищився і дорівнював 4,2 від. од., що підтверджує доцільність лікування і підтверджує інформативність даного нами способу оцінки АОС біологічного субстрату.

Порівняльна оцінка дослідження АОС проведена на кафедрі сімейної медицини та поліклінічної підготовки (зав. проф. О.М. Гіріна) у хворих на ішемічну хворобу серця. При проведенні порівняльних досліджень антиоксидантної стійкості нашим способом і способом-прототипом встановлені наступні значення:

Таблиця

Групи обстежених		
Контроль	Прототип МДА, мкм/л	Запропоноване рішення АОС
Б-ко	0,74	5,5
Х-ко	0,66	6,1
Г-ш	0,76	6,4
Г-ко	0,55	6,8
П-к	0,51	5,9
Св-щ	0,79	5,6
Мџт	0,67±0,05	6,05±0,4
Хворі ІХС		
Р-кнй	1,52	0,81
О-ова	0,64 (N)	1,2
О-ов	0,72 (N)	1,9
С-ко	1,14	1,36
П-ко	1,16	2,4
Х-ич	1,24	0,9
В-ко	0,75 (N)	1,13
М-кон	1,37	0,91
П-ой	1,12	2,1
Мџт	1,32±0,3	1,41±0,3

Як видно із таблиці, при оцінці за способом-прототипом АОС у 3-х із 9-ти хворих визначалася в межах контролю (34%). За нашим методом АОС у цих хворих була достовірно знижена, оскільки наш спосіб виявляє зміни АОС, пов'язані не тільки з перекисним окисленням ліпідів (ПОЛ), але і з окисленням білків, ДНК та інших молекул. Крім того, у цих хворих клінічне та лабораторно виявлялись ознаки запальних змін в організмі (артрити,

васкуліти, підвищена ШОЕ, позитивні ревапроби), що свідчить про активацію вільнорадикальних процесів та зниження АОС в організмі. Таким чином, визначення АОС за способом прототипу в 34% випадків дає помилкові значення цього показника, оскільки не дозволяє виявити активацію вільнорадикальних процесів в організмі, не пов'язану з ПОЛ. Це свідчить про більш високу точність оцінки АОС способом, що заявляється, по зрівнянню з прототипом і підтверджується клінічними та лабораторними даними.

Таким чином, даний спосіб являє собою новий підхід до вирішення поставленого завдання - підвищення точності визначення АОС біологічного субстрату. Крім того, він має ще й інші переваги порівняно з прототипом: скорочує терміни і зменшує вдвічі кількість етапів дослідження; ґрунтується на прямих автоматизованих вимірюваннях показника; передбачає використання спрощеної формули з індексуванням проміжних показників і врахуванням всіх можливих варіантів, що дозволяє відразу оцінити кінцевий результат.

Враховуючи важливе значення АОС в захисті організму від вільних радикалів і широке використання населенням антиоксидантних препаратів, існує висока необхідність розробки більш точних методів оцінки загальної АОС в різних тканинах організму. Наш спосіб призначений для об'єктивної оцінки стану антиоксидантної стійкості в біологічному матеріалі, отриманого в конкретного пацієнта, а також в системах *in vitro*, може використовуватися в широкій клінічній практиці і в науково-дослідних закладах з діагностичною та прогностичною метою.

Джерела інформації.

1. Гончаренко М.С., Лаптева А.М. Методы оценки пероксидации // Вопр. мед. химии. - 1985. - Т 31. - Вып. 3. - С. 12-23.
2. Клебанов Г.И. и др. Оценка антиоксидантной активности плазмы крови с применением желточных липопропротеидов // Лаб. дело. - 1988. - № 5. - С. 59.
3. Free Radicals in Medicine. British Med. Bull./Cheeseman K.N., Slater T.J.N.Y: Acad. Press, 1993. - 719 p.
4. Natural antioxidants in human health and disease / Balz Frei. Acad. Press: N.Y. London. Tokyo. Toronto, 1994. - P. 411-445.

ДП "Український інститут промислової власності" (Укрпатент)
Україна, 01133, Київ-133, бульв. Лесі Українки, 26
(044) 295-81-42, 295-61-97

Підписано до друку _____ 2001 р. Формат 60x84 1/8.
Обсяг _____ обл.-вид. арк. Тираж 50 прим. Зам. _____

УкрІНТЕІ, 03680, Київ-39 МСП, вул. Горького, 180.
(044) 268-25-22