



УКРАЇНА

(19) UA (11) 30962 (13) U  
(51) МПК (2006)  
G01N 33/48МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ  
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ТКАНИННОЇ ФІБРИНОЛІТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ У МОЛОДИХ І СТАРИХ ЩУРІВ

1

(21) u200708923  
(22) 02.08.2007  
(24) 25.03.2008  
(46) 25.03.2008, Бюл.№ 6, 2008 рік  
(72) ВИСОЦЬКА ВІОЛЕТТА ГЕОРГІЄВНА, UA, ПІШАК ВАСИЛЬ ПАВЛОВИЧ, UA, МАГАЛЯС ВІКТОР МИКОЛАЙОВИЧ, UA, ДІКАЛ МАР'ЯНА ВІКТОРІВНА, UA, САМАРАШ ВАСИЛЬ СЕМЕНОВИЧ, UA  
(73) МАГАЛЯС ВІКТОР МИКОЛАЙОВИЧ, UA  
(57) Спосіб визначення тканинної фібринолітичної активності у молодих і старих щурів, що включає

2

використання азофібрину в інкубаційній системі, яка містить гомогенати тканини, який відрізняється тим, що в інкубаційне середовище додається відома кількість плазміногену, азофібрину і гомогенати тканини, причому оцінку фібринолітичної активності проводять спектрофотометричним визначенням азобарвника, який вивільняється при лізисі азофібрину внаслідок інкубації з гомогенатом тканини.

Корисна модель відноситься до галузі біології і медицини і може бути використаною при клінічних діагностичних та наукових дослідженнях, а також при виконанні експериментальних науково-дослідних та дисертаційних робіт.

Відомий спосіб визначення фібринолітичної активності заснований на використанні фібринових пластин [Жила В.В., Кушнирук В.И. Местный фибринолиз почек. - К: Наукова думка, 1986. - 168с.; Наточин Ю.В. Основы физиологии почек. - М.: Медицина, 1982. - 280с.] має цілий ряд суттєвих недоліків:

I - фібринові пластини готуються нестандартно і мають невідому кількість плазміногену у вигляді домішок до фібриногену, які утворюються при виготовленні останнього;

II - при нанесенні зрізів тканин на фібриновий шар немає повного контакту тканинних активаторів плазміногену з плазміногеном, що міститься у фібрині;

III - в результаті відновлення неправильних геометричних фігур зони лізису дуже важко з достатнім ступенем точності визначати їх площу, за якою оцінюються тканинна фібринолітична активність.

В основі корисної моделі поставлено задачу розробити якісний новий спосіб визначення тканинної фібринолітичної активності шляхом використання азофібрину в інкубаційній системі, яка містить гомогенати тканини.

Даний спосіб немає недоліків прототипу, оскільки в інкубаційне середовище додається відома кількість плазміногену, азофібрину і гомогенати тканин, а оцінка результатів виконується спектрофотометричне (СФ-46).

Наводимо приклад використання запропонованого способу для визначення тканинної фібринолітичної активності у молодих і старих щурів.

За відомим методом аналізу тканинного фібринолізу вікових різниць тканинної фібринолітичної активності встановити не вдається [Братчик А.М. Клинические проблемы фибринолиза. - К.: Здоров'я. - 1993. - 344с.].

Під нембуталовим наркозом у щурів сіліконовим шприцем із черевної аорти забрали кров і одразу ж проводили забір тканини (головний мозок, серце, легені, печінку, нирки, тонку кишку). Наважки тканин відмивали від домішок крові в охолодженому боратному буфері (рН-7,4). Гомогенізацію проводили в скляному гомогенізаторі під візуальним контролем [Гоженко А.И. Некоторые общие закономерности формирования патологического процесса в почках // Труды VIII Всесоюзной конфер. по физиологии почек и водно-солевого обмена. - Харьков, 1989. - С.50].

По 0,5мл 5% гомогенату тканини вносили в 2 ряді пробірок з марками "СФА" (сумарна фібринолітична активність) і "НФА" (неферментативна фібринолітична активність). Пробірки "СФА" містять 5мг азофібрину, 10 ФО плазміногену (Simko Ltd, Львів); 1мл боратного буферу (рН - 7,4). В пробір-

(19) UA (11) 30962 (13) U

ки "НФА" крім того додається 20мг ε:(епсилон)-амінокапронової кислоти, яка пригнічує ферментативний фібриноліз. Дублікати пробірок (РП - розчин порівняння) замість гомогенату додається 0,5мл боратного буферу.

Всі пробірки одночасно інкубують у водяному термостаті "ТПС-1" при температурі 37°C протягом 15хв. за цей проміжок часу проходить розпад азофібрину і звільнення азобарвника в інкубаційній розчин відповідно фібринолітичної активності тканин.

Після інкубації всі пробірки одночасно охолоджують до 5°C для зупинки лізису азофібрину. В кожну пробірку додається для залужування середовища по 20мкл 5М розчину NaOH. Потім вміст пробірок фільтрується через шар вати, яка знаходиться в шприцах (слід запобігти відновлення піни). На спектрофотометрі (СФ-46) в кюветах 1,0см при довжині хвилі 440нм проти розчину порівняння проводять замір оптичної густини проб. Отримані екстинції перераховують на 1г тканини на 1 годину інкубації за формулою:

$$\text{СФА (НФА)} = (\text{E}_{440} \times 4 \times 100) : n(\text{мг}) = \text{E}_{440/\text{г тканини/год}},$$

де n - маса наважки органа.

Ферментативний фібриноліз (ФФА) визначається як різниця між сумарною та неферментативною активністю тканин. Збільшення часу інкубації не є доцільним, також, як збільшення наважки тканини, оскільки інтенсивність світлопоглинання роз-

чину може вийти за межі дозволяючої здатності приладу. Отже, оптимальний час 15хв, оптимальна наважка 10-100мг. Отримані дані наведені в Таблиці.

В головному мозку у старих щурів СФА була нижчою ніж у молодих тварин майже в 2 рази.

НФА зникала, а ФФА - достовірно знижувався. Достовірно зменшення тканинного фібринолізу спостерігається в серці, легенях (тільки НФА), печінках, нирках. Лише в тканинах тонкої кишки змін фібринолітичної активності тканини не спостерігалося.

Отже, на відміну від відомого прототипу, при якому не виявлено достовірних змін фібринолітичної активності, при користуванні запропонованим способом відмічено підвищення точності визначення фібринолітичної активності на 72%, що забезпечує даній корисній моделі "позитивний ефект".

Відповідність критерію "новизна" забезпечує даній корисній моделі те, що вперше для оцінки фібринолітичної активності використано азофібрин і гомогенати тканин.

Той факт, що оцінка фібринолітичної активності проводиться по лізісу азофібрину, при чому звільняється азобарвник, концентрація вимірюється спектрофотометричне і забезпечує вказаному методу відповідність критерію "суттєві відмінності".

Таблица

Стан тканинної фібринолітичної активності (E 440/г тканини/год)  
у молодих і старих щурів (x±Sx)

№ п/п	Тканини	Молоді щури (n=16)	Старі щури (n=16)	Ступінь достовірності
1.	Головний мозок:			
	СФА	196,73±25,81	79,85±3,44	p<0,001
	НФА	68,72±4,54	0,001±0,0001	p<0,001
2.	Серце:			
	СФА	273,50±56,32	70,98±10,97	p<0,01
	НФА	117,09±22,98	10,75±4,90	p<0,001
3.	Легені:			
	СФА	57,83±15,26	26,68±2,60	p<0,01
	НФА	27,43±5,50	9,99±1,50	
ФФА	30,38±10,33	16,69±1,80		
4.	Печінка:			
	СФА	26,71±3,19	11,27±1,22	p<0,001
	НФА	15,47±1,50	7,91±1,01	p<0,001
5.	Нирки:			
	СФА	93,85±15,07	32,50±2,87	p<0,001
	НФА	36,10±1,91	8,33±1,02	p<0,001
6.	Тонка кишка:			
	СФА	55,30±6,56	48,81±6,00	p<0,05
	НФА	20,89±2,33	21,93±2,93	
ФФА	34,41±7,29	26,88±3,66		

p - ступінь достовірності різниць показників;  
n - число спостережень.

Висновок. При користуванні запропонованим способом відмічено підвищення точності визначення фібринолітичної активності на 72%, що вперше для оцінки фібринолітичної активності використано азофібрин та гомогенати тканин, оцінка фібринолітичної активності проводиться по лізісу азофібрину при чому звільняється азобарвник, концентрація вимірюється спектрофотометрично.

Мета корисної моделі сформулювати спосіб визначення тканинної фібринолітичної активності у молодих і старих щурів.

Поставлена мета досягається тим, що для визначення фібринолітичної активності тканин використовується азофібрин та гомогенати тканин, оцінка фібринолітичної активності проводиться по лізісу азофібрину при чому звільняється азобарвник, концентрація вимірюється спектрофотометрично.

Технічне рішення:

Під нембуталовим наркозом у щурів сіліконовим шприцем із черевної аорти забрали кров і одразу ж проводили забір тканини (головний мозок, серце, легені, печінку, нирки, тонку кишку). Наважки тканин відмивали від домішок крові в охолодженому боратному буфері (рН - 7,4). Гомогенізацію проводили в скляному гомогенізаторі під візуальним контролем. По 0,5мл 5% гомогенату тканини вносили в 2 ряді пробірок з марками "СФА" (сумарна фібринолітична активність) і "НФА" (неферментативна фібринолітична активність). Пробірки "СФА" містять 5мг азофібрину, 10 ФО плазміногену (Simko Ltd, Львів); 1мл боратного буферу (рН-7,4). В пробірки "НФА" крім того додається 20мг  $\epsilon$ (епсилон)-амінокапронової кислоти, яка пригнічує ферментативний фібриноліз. Дублікати пробірок (РП - розчин порівняння) замість гомогенату додається 0,5мл боратного буферу. Всі пробірки одночасно інкубують у водяному термостаті "ТПС-1" при температурі 37°C протягом 15хв. за цей проміжок часу проходить розпад азофібрину і звільнення азобарвника в інкубаційній розчин відповідно фібринолітичній активності тканин. Після інкубації всі пробірки одночасно охолоджують до 5°C для зупинки лізісу азофібрину. В кожен пробірку додається для залужування середовища по 20мкл 5М розчину NaOH. Потім вміст пробірок фільтрується через шар вати, яка знаходиться в

шприцах (слід запобігти відновлення піни). На спектрофотометрі (СФ-46) в кюветах 1,0см при довжині хвилі 440нм проти розчину порівняння проводять замір оптичної густини проб.

Суть даного способу заключається в тому, що спосіб полягає в тому, що відмічено підвищення точності визначення фібринолітичної активності на 72%.

Висновок

Спосіб визначення тканинної фібринолітичної активності у молодих і старих щурів забезпечується тим, що при користуванні запропонованим способом відмічено підвищення точності визначення фібринолітичної активності на 72%, що вперше для оцінки фібринолітичної активності використано азофібрин та гомогенати тканин, оцінка фібринолітичної активності проводиться по лізісу азофібрину при чому звільняється азобарвник, концентрація вимірюється спектрофотометрично.

Відповідність критерію "новизна" забезпечує даній корисній моделі те, що вперше для оцінки фібринолітичної активності використано азофібрин і гомогенати тканин.

Той факт, що оцінка фібринолітичної активності проводиться по лізісу азофібрину при чому звільняється азобарвник, концентрація вимірюється спектрофотометрично і забезпечує вказаному методу відповідність критерію "суттєві відмінності".

Отже, на відміну від відомого прототипу, при якому не виявлено достовірних змін фібринолітичної активності, при користуванні запропонованим способом відмічено підвищення точності визначення фібринолітичної активності на 72%, що забезпечує даному винаходу "позитивний ефект".

Джерела інформації:

1. Братчик А.М. Клинические проблемы фибринолиза. - К.: Здоров'я. - 1993. -344с.
2. Гоженко А.И. Некоторые общие закономерности формирования патологического процесса в почках // Труды VIII Всесоюзной конфер. по физиологии почек и водно-солевого обмена. - Харьков, 1989. - С.50.
3. Жила В.В., Кушнирук В.И. Местный фибринолиз почек. - К: Наукова думка, 1986. - 168с.
4. Наточин Ю.В. Основы физиологии почек. - М.: Медицина, 1982. - 280с.