



УКРАЇНА

(19) UA (11) 31683 (13) U
(51) МПК (2006)
G01N 33/49МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ЗАГАЛЬНОЇ АНТИОКСИДАНТНОЇ АКТИВНОСТІ ПЛАЗМИ (СИРОВАТКИ) КРОВІ

1

(21) u200709374
(22) 17.08.2007
(24) 25.04.2008
(46) 25.04.2008, Бюл.№ 8, 2008 р.
(72) МЕЩИШЕН ІВАН ФЕДОРОВИЧ, UA, ПІШАК
ВАСИЛЬ ПАВЛОВИЧ, UA, МАГАЛЯС ВІКТОР МИ-
КОЛАЙОВИЧ, UA, ПОЛЬОВИЙ ВІКТОР ПАВЛО-
ВИЧ, UA, ВИСОЦЬКА ВІОЛЕТТА ГЕОРГІВНА, UA
(73) МАГАЛЯС ВІКТОР МИКОЛАЙОВИЧ, UA
(57) Спосіб визначення загальної антиоксидантної
активності плазми (сироватки) крові, який відрі-
зняється тим, що на льоду готується 5%-ний гомо-
генат головного мозку щура (в дослідках викорис-
товували тварин масою 180 ± 15 г) на трис-НСІ-
буфері, рН 7,4 (500мг мозку гомогенізували у
9,5мл буфера), центрифугують 10хв. при

2

3000об/хв., одержаний центрифугат (2мл) вносять
в центрифужні пробірки об'ємом 10мл, в дослідні
проби додають 0,1мл сироватки (плазми) крові,
а в контрольні - 0,1мл буфера, проби інкубують
60хв. у водяному термостаті при 37°C, після чого
реакцію зупиняють, вносячи в проби по 2мл охо-
лодженої 10 %-ної трихлороцтової кислоти, проби
центрифугують (10хв. при 3000об/хв.) і в одержа-
ному центрифугаті визначають вміст МА, для цьо-
го в хімічні пробірки вносять 3мл центрифугату,
мл 0,8%-ної тіобарбітурової кислоти і ставлять в
киплячу водяну баню на 15хв., після охолодження
вимірюють оптичну густину контрольних і дослід-
них проб на спектрофотометрі СФ-46 при 532нм в
10мм кварцових кюветах.

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

Розроблено спосіб визначення загальної ан-
тиоксидантної активності плазми (сироватки) крові.
Він заснований на гальмуванні плазмою (сироват-
кою) крові пероксидного окиснення ліпідів головно-
го мозку щурів і характеризується простотою вико-
нання, доступністю реактивів і доброю
відтворюваністю.

На сьогодні не викликає сумніву той факт, що
виникнення і розвиток широкого кола захворювань
людини і тварин супроводжується активацією ві-

льнорадикальних реакцій пероксидного окиснення
ліпідів та окисної модифікації білків [1, 2, 3].

Основними механізмами активації таких реак-
цій є значне збільшення генерації радикалів кис-
ню, так званих активних форм кисню (АФК) - супе-
роксидного аніонрадикалу (O_2^-), гідроксильного
радикалу (ОН), синглетного кисню (1O_2), пероксиду
водню (H_2O_2), гіпохлоританіону (ClO^-) тощо, а та-
кож вивільнення іонів заліза (Fe^{2+}) із його клітин-
них депо.

Процесу запуску і розвитку вільнорадикальних
реакцій протистоять антиоксиданти. Основні анти-
оксиданти плазми крові та механізм їх дії подано в
табл. 1 (2, 4) з подальшим доповненням.

(19) UA (11) 31683 (13) U

Таблиця 1

Основні антиоксиданти плазми (сироватки) крові та механізм їх дії

Антиоксиданти	Механізм дії
Жиророзчинні: Вітамін Е Вітамін А і каротиноїди Стероїдні гормони Білірубін Водорозчинні: Церулоплазмін Трансферин Альбумін Вітамін С Мелатонін HS-групи білків і глутатіону Сечова кислота Супероксиддисмутаза	$O_2^{\cdot -}$, OH^{\cdot} , 1O_2 , ROO^{\cdot} , R^{\cdot} 1O_2 , ROO^{\cdot} , R^{\cdot} ROO^{\cdot} , R^{\cdot} ROO^{\cdot} , R^{\cdot} , 1O_2 $O_2^{\cdot -}$, $OCI_2^{\cdot -}$, Fe^{2+} у Fe^{3+} зв'язує Fe^{3+} $O_2^{\cdot -}$, $OCI_2^{\cdot -}$ ROO^{\cdot} , R^{\cdot} , $O_2^{\cdot -}$, відновлює вітамін Е – радикал до вітаміну Е $O_2^{\cdot -}$, OH^{\cdot} , ROO^{\cdot} , R^{\cdot} ROO^{\cdot} , R^{\cdot} OH^{\cdot} , 1O_2 , ROO^{\cdot} , зв'язує Fe^{2+} і Fe^{3+} $O_2^{\cdot -}$

Примітка: R і ROO – ліпідний і ліпопероксидний радикали відповідно.

Антиоксидантні компоненти плазми (сироватки) крові теоретично можуть бути визначені шляхом вимірювання їх кількості чи активності (для ферментів). Однак на практиці це виявилось неможливим із-за трудомістких аналізів і синергізму дії різних антиоксидантів. У зв'язку з цим впродовж останніх 35-40 років розробляються методики для визначення сумарної антиоксидантної активності інгібіторів вільнорадикальних реакцій, які присутні в біологічних рідинах (сироватка крові, слина, сльози, ліквор тощо), гомогенатах органів і тканин, суспензіях мембран і ліпопротеїнів.

Люба методика визначення антиоксидантної активності (АОА) в біологічних рідинах заснована на використанні модельної системи, яка включає як мінімум два компоненти: механізм утворення (генерації) певного виду вільних радикалів і систему їх виявлення (детекції) безпосередньо чи продуктів їх дії на ліпіди, білки і нуклеїнові кислоти.

Безпосереднє визначення АФК вимагає складної і дорогої апаратури (хемілюмінесценція, електрохемілюмінесценція, флюоресценція, полярографія, циклічна вольтметрія, манометрія, спектрофотометрія), яка на сьогодні є недоступною для більшості лабораторій України.

Нами розроблений метод визначення сумарної антиоксидантної активності плазми (сироватки) крові, який характеризується простотою виконання, доступністю реактивів і доброю відтворюваністю.

Принцип методу. Гомогенати головного мозку щурів, які характеризуються найбільшим вмістом ліпідів, піддаються спонтанному пероксидному окисненню з утворенням одного із кінцевих продуктів – малонового альдегіду (МА). По кількості утво-

реного МА судили про загальну (сумарну) антиоксидантну активність плазми (сироватки) крові.

Хід виконання. На льду готується 5%-ний гомогенат головного мозку щура (в дослідях використовували тварин масою 180 ± 15 г) на трис-НCl-буфері, рН 7,4 (500мг мозку гомогенізували у 9,5мл буферу), центрифугували 10хв при 3000об/хв. Одержаний центрифугат (2мл) вносили в центрифужні пробірки об'ємом 10мл. В дослідні проби додавали 0,1мл сироватки (плазми) крові, а в контрольні - 0,1мл буферу. Пробірки інкубували 60хв у водяному термостаті при 37°C після чого реакцію зупиняли, вносячи в проби по 2мл охолодженої 10%-ної трихлороцтової кислоти. Пробірки центрифугували (10хв при 3000об/хв) і в одержаному центрифугаті визначали вміст МА. Для цього в хімічні пробірки вносили 3мл центрифугату, 1мл 0,8%-ної тіобарбітурової кислоти і ставили в кип'ячу водяну баню на 15хв. Після охолодження вимірювали оптичну густину контрольних і дослідних проб на спектрофотометрі СФ-46 при 532нм в 10мм кварцових кюветах.

Загальну антиоксидантну активність (ЗАОА) виражали в процентах і розраховували за формулою:

$$ЗАОА(\%) = \frac{D_k - D_d}{D_k} \cdot 100,$$

де D_k - оптична густина контрольної проби;

D_d - оптична густина дослідної проби.

Проведені дослідження показали, що максимальна антиоксидантна дія має місце при використанні 0,1мл сироватки (плазми) крові. Нами вивчено вплив часу (тривалості) інкубації на величину антиоксидантної дії (табл. 2).

Таблиця 2

Час інкубації, хв Умови досліджу	30		60		90		120	
	Е	% гальмування	Е	% гальмування	Е	% гальмування	Е	% гальмування
Дослід	0,139± 0,004	36,2± 1,22	0,121± 0,006	47,4± 1,45	0,138± 0,004	43,2± 1,48	0,142± 0,005	42,5± 1,52
Контроль	0,218± 0,006		0,230± 0,008		0,240± 0,006		0,250± 0,008	

Примітка: Е – оптична густина продуктів ПОЛ, що взаємодіють з тіобарбітуровою кислотою – ТБК-активні продукти.

Як витікає із даних табл. 2 максимальна антиоксидантна активність плазми крові щурів, вираженої в процентах гальмування спонтанного пероксидного окиснення ендogenous ліпідів головного мозку, спостерігається на 60хв. інкубації.

Висновок. Розроблено метод визначення загальної антиоксидантної активності плазми (сироватки) крові. Він заснований на гальмуванні плазмою (сироваткою) крові пероксидного окиснення ліпідів головного мозку щурів і характеризується простотою виконання, доступністю реактивів і доброю відтворюваністю та подальших дослідженнях вивчення стану загальної антиоксидантної активності плазми (сироватки) крові при різноманітних захворюваннях, а також проведення скринінгових досліджень оригінальних речовин з метою виявлення серед них антиоксидантів.

Література

1. Каримов І.З. Окисна модифікація білків і перекисне окиснення ліпідів у розвитку метаболічної інтоксикації при патології //Лаб.діагностика. - 2005. - №1 (31). - С.7-13.
2. Мецишен І.Ф., Пішак В.П., Григор'єва Н.П. Основи обміну речовин та енергії. Навчальний посібник. - Чернівці: Медуніверситет, 2005. - 192с.
3. Мецишен І.Ф., Польовий В.П. Механізм окиснювальної модифікації білків //Буковинський мед.вісник. - 1999. - Т.33, №1.-С.196-205.
4. Colleen S., Marks A.D., Lieberman M. Basic Medical Biochemistry. A clinical approach. - Lippincott Williams and Wilkins, USA, 2005. - 977p.

Мета корисної моделі. Охарактеризувати спосіб визначення загальної антиоксидантної активності плазми (сироватки) крові.

Поставлена мета досягається тим, що гомогенати головного мозку щурів, які характеризуються найбільшим вмістом ліпідів, піддаються спонтанному пероксидному окисненню з утворенням одного із кінцевих продуктів - малонового альдегіду (МА). По кількості утвореного МА судили про загальну (сумарну) антиоксидантну активність плазми (сироватки) крові.

Технічне рішення: на льду готується 5%-ний гомогенат головного мозку щура (в дослідках використовували тварин масою 180±15г) на трис-НСІ-буфері, рН 7,4 (500мг мозку гомогенізували у 9,5мл буферу), центрифугували 10хв при

3000об/хв. Одержаний центрифугат (2мл) вносили в центрифужні пробірки об'ємом 10мл. В дослідні проби добавляли 0,1мл сироватки (плазми) крові, а в контрольні - 0,1мл буферу. Проби інкубували 60хв у водяному термостаті при 37°С після чого реакцію зупиняли, вносячи в проби по 2мл охолодженої 10%-ної трихлороцтової кислоти. Проби центрифугували (10хв при 3000об/хв) і в одержаному центрифугаті визначали вміст МА. Для цього в хімічні пробірки вносили 3мл центрифугату, 1мл 0,8%-ної тіобарбітурової кислоти і ставили в кип'ячу водяну баню на 15хв. Після охолодження вимірювали оптичну густина контрольних і дослідних проб на спектрофотометрі СФ-46 при 532нм в 10мм кварцових кюветах.

Суть даного способу заключається в тому, що спосіб визначення загальної антиоксидантної активності плазми (сироватки) крові. Розроблено спосіб визначення загальної антиоксидантної активності плазми (сироватки) крові. Він заснований на гальмуванні плазмою (сироваткою) крові пероксидного окиснення ліпідів головного мозку щурів і характеризується простотою виконання, доступністю реактивів і доброю відтворюваністю та подальших дослідженнях вивчення стану загальної антиоксидантної активності плазми (сироватки) крові при різноманітних захворюваннях, а також проведення скринінгових досліджень оригінальних речовин з метою виявлення серед них антиоксидантів.

Висновок

Спосіб визначення загальної антиоксидантної активності плазми (сироватки) крові розроблено завдяки визначенню загальної антиоксидантної активності плазми (сироватки) крові. Спосіб заснований на гальмуванні плазмою (сироваткою) крові пероксидного окиснення ліпідів головного мозку щурів і характеризується простотою виконання, доступністю реактивів і доброю відтворюваністю.

Відповідність критерію "новизна" даного способу відрізняється тим, що вперше досліджені гомогенати головного мозку щурів, які характеризуються найбільшим вмістом ліпідів, піддаються спонтанному пероксидному окисненню з утворенням одного із кінцевих продуктів - малонового альдегіду (МА). По кількості утвореного МА судили про загальну (сумарну) антиоксидантну активність плазми (сироватки) крові.

Відповідність критерію "суттєві відмінності" даного способу забезпечується тим, що аналогів немає.

Відповідність даного винаходу критерію "позитивний ефект" забезпечується результатами клінічних та експериментальних досліджень, які вперше засвідчують визначення загальної

антиоксидантної активності плазми (сироватки) крові. Він заснований на гальмуванні плазмою (сироваткою) крові пероксидного окиснення ліпідів головного мозку щурів і характеризується простотою виконання, доступністю реагентів і доброю відтворюваністю.