

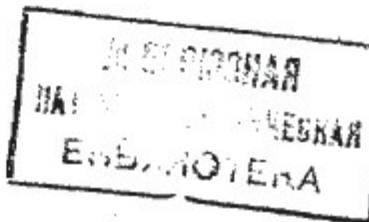


СОЮЗ СОВЕТСКИХ  
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ  
РЕСПУБЛИК

(19) SU (11) 1561034 A1

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ  
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ  
ПРИ ГННТ СССР

(51) 5 G 01 N 33/48, 33/52



## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

(21) 4254290/28-14

(22) 01.06.87.

(46) 30.04.90. Бюл. № 16

(71) Гродненский государственный  
медицинский институт

(72) В.С. Васильев, Г.К. Новицкий,  
В.М. Цыркунов и Ф.С. Ларин

(53) 612.015 (088.8)

(56) British J. Haemotol., 1971,  
v. 20, № 1, p. 95-107.

(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ К СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОМУ ОКИСЛЕНИЮ ЛИПИДОВ

(57) Изобретение относится к биологии и медицине и может быть использовано в эксперименте и клинике для

Изобретение относится к области биологии и медицины, а именно к методам лабораторной диагностики, и может быть использовано в эксперименте и клинике для определения чувствительности эритроцитов к перекисному окислению липидов.

Цель изобретения - повышение специфичности и физиологичности способа при одновременном его ускорении.

Способ осуществляют следующим образом.

Из 2 мл венозной крови выделяют эритроциты центрифугированием при 300 г в течение 10 мин, в качестве антикоагулянта используют гепарин - 200 ЕД/мл крови. Плазму и верхний слой эритроцитов, содержащий лейкоциты, удаляют отсасыванием. Полученный осадок эритроцитов дважды отмыва-

2

определения чувствительности эритроцитов к перекисному окислению липидов. Цель - повышение специфичности и физиологичности способа при одновременном его ускорении. Центрифугируют 2 мл венозной крови, 0,25 мл осадка эритроцитов смешивают с 2,4 мл физиологического раствора, добавляют спиртовой раствор витамина D<sub>2</sub>, инкубируют 30 мин, затем добавляют 1,0 мл 50%-ной трихлоруксусной кислоты, центрифугируют. К надосадочной жидкости добавляют раствор соляной кислоты и тиобарбитуровой кислоты, кипятят и спектрофотометрируют. Способ позволяет чаще определять наличие малонового диальдегида.

ют, добавляя четырехкратный объем охлажденного физиологического раствора хлорида натрия и осаждая клетки центрифугированием при 300 г в течение 15 мин. Надосадочную жидкость вместе с верхним слоем эритроцитов удаляют отсасыванием.

0,25 мл осадка эритроцитов смешивают с 2,4 мл забуференного физиологического раствора NaCl (50 мл 0,15 М фосфатного буфера pH 7,4 смешивают с 450 мл 0,9% раствора NaCl) и 0,35 мл 0,5% спиртового раствора эргокальциферола (витамина D<sub>2</sub>). В контрольные пробирки вместо спиртового раствора витамина D<sub>2</sub> добавляют равное количество эталона. Инкубацию проводят в течение 30 мин при 37°C в водной бане. После инкубации в пробы медленно добавляют, тщательно перемешивая,

(19) SU (11) 1561034 A1

1,0 мл 50% трихлоруксусной кислоты. Пробирки центрифугируют 15 мин при 300 г. В чистые пробирки отбирают 2,0 мл надосадочной жидкости, к которой добавляют 0,2 мл 1 н. раствора соляной кислоты и 0,8 мл 0,12 М раствора тиобарбитуровой кислоты. После кипячения в течение 10 мин жидкость приобретает розовую окраску, по интенсивности которой и судят о количестве образовавшегося малонового диальдегида (МДА) - в кювете 1 см определяют оптическую плотность раствора при 532 нм против контроля на реактивы.

Расчет продукции МДА в эритроцитах осуществляют с использованием закона Бугера-Ламберта-Бера по формуле:

$$C = \frac{\Delta E_{532} \cdot K_1 \cdot K_2 \cdot V_1 \cdot V_2}{\epsilon \cdot V_3} = \Delta E_{532} \cdot 307,69,$$

где С - продукция МДА в 1 мл осадка эритроцитов за 1 ч инкубации;

$\Delta E_{532}$  - разность экстинкции опытной и контрольной проб на 532 нм;

$V_1$  - объем пробы для спектрофотометрирования;

$V_2$  - объем пробы после остановки инкубации;

$V_3$  - объем пробы, отобранный для постановки цветной реакции;

$K_1$  - коэффициент пересчета времени инкубации;

$K_2$  - коэффициент пересчета на 1 мл осадка эритроцитов;

$\epsilon$  - коэффициент молярной экстинкции, выраженный в нм/мл (0,156).

К 28-33 мин продукция МДА почти достигает максимума и мало изменяется при удлинении инкубации до 1 ч. В пределах интервала времени 28-33 мин прирост продукции МДА является не значительным, поэтому оптимальным временем инкубации следует считать 28-33 мин.

Пример 1. Из 2 мл венозной крови центрифугированием выделяют эритроциты, в качестве антикоагулянта используют гепарин - 200 ЕД/мл крови. Плазму и верхний слой эритроцитов удаляют. Осадок эритроцитов дважды отмывают четырехкратным объемом охлажден-

ного физиологического раствора хлорида натрия, осаждая клетки центрифугированием при 300 г в течение 15 мин. Надосадочную жидкость вместе с верхним слоем эритроцитов удаляют.

0,25 мл осадка эритроцитов смешивают с 2,4 мл забуференного 0,9% раствора NaCl и 0,35 мл 0,5% спиртового раствора витамина D<sub>2</sub>. Конечная концентрация 0,06%. В контрольные пробирки вместо спиртового раствора эргокальциферола добавляют равное количество этанола. Инкубацию проводят в течение 30 мин при 37°C в водяной бане. После инкубации во все пробирки медленно добавляют, тщательно перемешивая, 1,0 мл 50% раствора трихлоруксусной кислоты. Пробирки центрифугируют 15 мин при 300 г. В чистые пробирки отбирают 2,0 мл надосадочной жидкости, к которой добавляют 0,2 мл 1 н. раствора соляной кислоты и 0,8 мл 0,12 М раствора тиобарбитуровой кислоты. После кипячения в течение 10 мин наблюдают появление розовой окраски раствора, интенсивность которой измеряют спектрофотометрически при 532 нм против контроля на реактивы. По формуле рассчитывают содержание МДА, которое в данном случае равно 34,07 нМ/мл·ч. Содержание МДА в эритроцитах этой же пробы крови, определенное по прототипу, составило 37,84 нМ/мл·ч.

Процесс инкубации эритроцитов составляет 30 мин против 1 ч (прототип), а вместо высокотоксичного и взрывоопасного азида натрия использован нетоксичный и невзрывоопасный эргокальциферол, что обеспечивает сокращение времени и упрощение выполнения предлагаемого способа.

Пример 2. Получают осадок эритроцитов, как указано в примере 1. 0,25 мл осадка эритроцитов смешивают с 2,4 мл забуференного раствора NaCl и 0,35 мл 0,5% спиртового раствора эргокальциферола. В контрольные пробирки вместо спиртового раствора витамина D<sub>2</sub> добавляют равное количество этанола. Инкубацию проводят в течение 28 мин при 37°C в водяной бане. Дальнейшая последовательность операций аналогична примеру 1. Спектрофотометрическая регистрация интенсивности розовой окраски раствора при длительности инкубации 28 мин и последующий пересчет показывают, что

количество МДА в данном случае равно 33,89 нМ/мл·ч. Содержание МДА в эритроцитах этой же пробы крови, определенное по прототипу, составило 37,59 нМ/мл·ч.

**П р и м ер 3.** Осадок эритроцитов получают аналогично примеру 1. 0,25 мл осадка эритроцитов смешивают с 2,4 мл забуференного физиологического раствора NaCl и 0,35 мл 0,5% спиртового раствора эргокальциферола. В контрольные пробирки вместо эргокальциферола добавляют равное количество этанола. Инкубацию проводят в течение 33 мин при 37°C в водяной бане. Последующее выявление образовавшегося МДА проводят аналогично примеру 1. В данном случае при длительности инкубации 33 мин количество МДА равно 34,22 нМ/мл·ч. Содержание МДА в эритроцитах этой же пробы крови, определенное по прототипу, составило 37,84 нМ/мл·ч.

Анализ полученных данных свидетельствует, что при использовании предлагаемого способа у больных с холестазом определяется повышенная продукция МДА (что подтверждается повышенным накоплением гидроперекисей),

а при использовании прототипа подобные изменения не были выявлены. Указанное подтверждает большую специфичность и физиологичность предлагаемого способа по отношению к известному техническому решению.

В таблице приведены данные о продукции эритроцитарного МДА и содержании гидроперекисей (определяют хемилюминесцентным методом) в мембранах эритроцитов больных вирусным гепатитом В средней степени тяжести (с более тяжелым холестатическим вариантом заболевания и без него).

#### Ф о р м у л а изобретения

**Способ определения чувствительности мембран эритроцитов к свободнорадикальному окислению липидов путем их инкубации с прооксидантом, добавления тиобарбитуровой кислоты и спектрофотометрирования, отличающийся тем, что, с целью повышения специфичности и физиологичности способа при одновременном его ускорении инкубацию проводят с раствором эргокальциферола в конечной концентрации 30,06% в течение 28-33 мин.**

Обследуемые группы	Продукция МДА (прототип)	Продукция (предлагаемый способ)	Светосумма "быстрой" вспышки хемилюминесценции мембран эритроцитов имп/мин
Контроль (n = 12)	43,26±2,72	36,92±1,74	6875±275,4
Больные без холестаза (n = 11)	83,69±3,82	79,15±2,52	15217,4±650,2*
Больные с холестазом (n = 16)	86,05±3,75	118,81±4,70 <sup>**</sup>	20140±678,1 <sup>**</sup>

\* достоверные различия по отношению к контролю ( $P < 0,05$ );

\*\* достоверные различия между группами больных ( $P < 0,05$ ).

Редактор О. Спесивых

Составитель Н. Гуляева  
Техред Л. Олийнык

Корректор М. Кучерявая

Заказ 975

Тираж 525

Подписьное

ВНИИПИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР  
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Производственно-издательский комбинат "Патент", г.Ужгород, ул. Гагарина, 101