



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(51) МПК  
*A61B 10/00* (2006.01)  
*G01N 33/52* (2006.01)

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2009129981/14, 04.08.2009

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
04.08.2009

(45) Опубликовано: 27.12.2010 Бюл. № 36

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: ГАЛАКТИОНОВА Л.П. и др. Состояние перекисного окисления у больных с язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки. Клиническая лабораторная диагностика, 1998, №6, с.10-14. RU 2235998 С2, 10.09.2004. US 6269261 В1, 31.07.2001. US 5950634 А, 14.09.1999. КИМ В.Н. и др. Метод биофотонного сканирования в оценке уровня содержания (см. прод.)

Адрес для переписки:

690002, Приморский край, г.Владивосток,  
ГСП, пр-кт Острякова, 2, ГОУ ВПО ВГМУ  
Росздрава, патентный отдел, А.С. Банковой

(72) Автор(ы):

Лукьянов Павел Александрович (RU),  
Потапов Владимир Николаевич (RU),  
Лупач Наталья Михайловна (RU),  
Веселкина Елена Юрьевна (RU),  
Хлудеева Елена Альфредовна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Владивостокский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию" (ГОУ ВПО ВГМУ Росздрава) (RU), Тихоокеанский институт биоорганической химии Дальневосточного отделения Российской академии наук (ТИБОХ ДВО РАН) (RU)

## (54) СПОСОБ ОЦЕНКИ ОБЩЕГО ОКСИДАНТНОГО СТАТУСА ОРГАНИЗМА

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к внутренним болезням, диагностике. Способ основан на определении общей оксидантной активности (ООА) и общей антиоксидантной активности (ОАА) с последующим определением оксидантного индекса (ОИ), который равен отношению ООА к ОАА. Согласно изобретению общую оксидантную активность определяют по степени окисления эхинохрома А компонентами оксидантной системы сыворотки или плазмы крови, а общую антиоксидантную активность определяют по степени окисления эхинохрома А хлорамином В, добавленного к сыворотке или плазме

крови. Показатель ОИ здоровых доноров принят за единицу. Значение ОИ больше единицы свидетельствует о дисбалансе общего оксидантного статуса организма. Способ обеспечивает уменьшение до 20 раз количества анализируемой сыворотки или плазмы в сравнении со стандартной методикой, сокращение времени проведения анализа с 72 часов до 2 часов. При масштабировании можно провести анализ более 500 проб за один день, используя микропланшеты и микропланшетные спектрофотометры. Способ прост в исполнении, экономичен и не требует большого объема термостатируемых камер. 1 табл.

(56) (продолжение):

каротиноидов, антиоксидантного и оксидантного статуса у здоровых и больных лиц с факторами риска атеросклероза. Бюллетень сибирской медицины, 2007, №4, с.31-36. JOSEPH J.C., STAVENS S. et al. Associations of antioxidant status, oxidative stress with skin carotenoids assessed by Raman

R U 2 4 0 7 4 5 0 C 1

R U 2 4 0 7 4 5 0 C 1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

*A61B 10/00* (2006.01)*G01N 33/52* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2009129981/14, 04.08.2009**(24) Effective date for property rights:  
**04.08.2009**(45) Date of publication: **27.12.2010 Bull. 36**

Mail address:

**690002, Primorskij kraj, g. Vladivostok, GSP, pr-  
kt Ostrjakova, 2, GOU VPO VGMU Roszdrava,  
patentnyj otdel, A.S. Bankovoj**

(72) Inventor(s):

**Luk'janov Pavel Aleksandrovich (RU),  
Potapov Vladimir Nikolaevich (RU),  
Lupach Natal'ja Mikhajlovna (RU),  
Veselkina Elena Jur'evna (RU),  
Khludeeva Elena Al'fredovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Gosudarstvennoe obrazovatel'noe uchrezhdenie  
vysshego professional'nogo obrazovanija  
"Vladivostokskij gosudarstvennyj meditsinskij  
universitet Federal'nogo agentstva po  
zdravookhraneniju i sotsial'nomu razvitiju" (GOU  
VPO VGMU Roszdrava) (RU).  
Tikhookeanskij institut bioorganicheskoj khimii  
Dal'nevostochnogo otdelenija Rossijskoj akademii  
nauk (TIBOKh DVO RAN) (RU)**

**(54) METHOD OF ESTIMATING GENERAL OXIDANT STATUS OF ORGANISM**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to medicine, namely to internal diseases, diagnostics. Method is based on determination of general oxidant activity (GOA) and general antioxidant activity (GAA) with further determination of oxidant index (OI), which equals ratio of GOA to GAA. In accordance with the invention oxidant activity is determined by degree of echinochrome A oxidation by components of oxidant system of blood serum or plasma, and general antioxidant activity is determined by degree of echinochrome A oxidation with chloramine B, added to blood serum or plasma. OI index of healthy donor

is taken as a unit. OI value higher than a unit testifies to disbalance of general oxidant status of organism. Method ensures up to 20 fold reduction of amount of analysed serum or plasma in comparison with standard methodology, reduction for carrying out analysis from 72 hours to 2 hours. When ranging it is possible to perform analysis of more than 500 samples during one day, using microboards and microplate spectrophotometers.

EFFECT: method is simple in implementation, economical and does not require large volume of thermostatically controlled chambers.

1 tbl, 2 ex

Изобретение относится к медицине, а именно к внутренним болезням, диагностике.

В норме процесс перекисного окисления липидов (ПОЛ) протекает в живых системах сбалансировано, удерживается на оптимальном стационарном уровне, благодаря наличию защитной системы организма, представляющей собой иерархию

5 антиоксидантных систем (Зенков Н.К., Ланкин В.З. Окислительный стресс. Биохимические, патофизиологические аспекты. - М.: Наука / Интерпериодика, 2001. - 490 с.). Первую линию защиты образуют антиоксидантные ферменты, каждый из которых инактивирует одну из активных форм кислорода (АФК):  $O_2$  (СОД),  $H_2O_2$  (каталаза),  $ROOH$  (глутатионпероксидаза). В нормальных условиях жизнедеятельности, при функционировании живых систем в условиях физиологического оптимума существует про- и антиоксидантное равновесие, которое является важнейшим механизмом окислительного гомеостаза. Равновесие это носит подвижный характер, представляет собой сбалансированное действие

15 противоположно направленных процессов и характеризуется колебательным режимом функционирования в пределах, совместимых с жизнью, и сохранением гомеостаза. Всякого рода повреждения структур живой системы, вызванные экзо- и эндогенными агентами, неизбежно сопровождаются активацией ПОЛ, сдвигом про- и

20 антиоксидантного равновесия.

Интенсификация свободнорадикальных процессов в тканях может быть следствием гиперпродукции АФК и свободных радикалов и/или дефицита природных антиоксидантов и снижения активности других защитных систем клетки, включая антиоксидантные ферменты. Подобное физиологическое состояние клеток, сопряженное с нарушением нормальной регуляции свободнорадикальных реакций, в литературе принято называть «окислительным стрессом» (Барабой В.А. и др. // Перекисное окисление и стресс. - СПб.: Наука, 1992. - 148 с.; Зенков Н.К., Ланкин В.З. Окислительный стресс. Биохимические, патофизиологические аспекты. - М.: Наука /

25 Интерпериодика, 2001. - 490 с.). В настоящее время считают, что окислительный стресс является универсальным механизмом клеточных повреждений, приводящих к развитию разнообразных патологических состояний, включая программированную гибель клеток - апоптоз.

Наиболее приемлемым для характеристики заболеваний, в развитии которых

35 важную роль играют нарушения регуляции свободнорадикальных процессов, представляется термин «свободнорадикальные болезни» (Ланкин В.З. Атеросклероз как пример свободно-радикальной патологии / биоантиоксиданты. - Тюмень, 1997. - С.51-53). Примерами свободнорадикальной патологии являются атеросклероз,

40 ишемическая болезнь сердца (ИБС) и другие заболевания сердечно-сосудистой системы, воспаление, заболевания желудочно-кишечного тракта - неспецифический язвенный колит (НЯК), болезнь Крона, хронический панкреатит, бронхолегочные заболевания и многие другие.

В патогенезе ИБС важную роль играют нарушения процессов ПОЛ. При переходе

45 стабильной стенокардии напряжения в нестабильную форму и далее в инфаркт миокарда наблюдается усиление выраженности нарушений ПОЛ и снижение функции антиоксидантной системы. В исследованиях показано, что у больных стенокардией повышено содержание липопероксидов в крови, тогда как активность

50 утилизирующего липопероксида фермента - GSH-пероксидазы, напротив, достоверно снижена по сравнению со здоровыми людьми. У больных с нестабильной стенокардией увеличение содержания липопероксидов и снижение активности GSH-пероксидазы в крови выражены в большей степени, чем у больных со стабильной

стенокардией (Голиков А.П. и др. Перекисное окисление липидов при ишемической болезни сердца. // Физиология человека. - Т.23, №6. - 1997. - С.49-56).

В литературе имеются данные об участии ПОЛ в возникновении и прогрессировании хронических воспалительных заболеваний кишечника (НЯК) (Супрун Е.В. Стан окислительно-антиоксидантного гомеостаза у хворих на хронічний коліт. // Проблеми екологічної та медичної генетики і клін. імунології. - К.-Луганськ-Харків, 2002. - Вип.3. - С.96-100).

Важным механизмом воздействия циркулирующих иммунных комплексов при НЯК является их способность повреждать клеточные мембраны, что приводит к оксидантному стрессу (Пасиешвили Л.М. Возникновение вторичной иммунной недостаточности и ее роль в течении хронических воспалительных заболеваний кишечника. Сучасна гастроентерологія, №2(8), 2002 р., стр.16-17). С позиций перекисного гомеостаза отмечены нарушения, обеспечивающие прогрессирование эндотоксикации, а также потенцирование иммунопатологического процесса в тканях. Таким образом, интенсификация свободнорадикального окисления на фоне депрессии антиоксидантной системы поддерживает локальный патологический процесс, способствует нарушению микроциркуляции и процессов обмена в тканях пораженного органа, что в конечном итоге может привести к дегенерации тканей.

Существует стандартная методика определения оксидантного статуса организма, основанная на определении общей оксидантной активности (ООА) и общей антиоксидантной активности (ОАА) [Л.П.Галактионова и др. Состояние перекисного окисления у больных с язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки. Клиническая лабораторная диагностика, №6, 1998, с.10-14].

ООА определяют по накоплению в модельной системе конечного продукта перекисного окисления - малонового диальдегида (МДА). В качестве субстрата используют твин-80, а в качестве инициатора - плазму крови. Реагенты: 1% раствор твина-80; 40% раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ); 0,25% раствор тиобарбитуровой кислоты (ТБК). В герметично закрываемую посуду из темного стекла объемом 250 мл вносят по 2 мл твина-80. В опытную пробу прибавляют 0,2 мл плазмы крови, а в контрольную пробу прибавляют соответствующий объем дистиллированной воды. Далее пробы инкубируют при температуре 40°C в течение 48 ч. После этого в каждую пробу добавляют по 1 мл ТХУ и оставляют при комнатной температуре на 60 мин. Затем центрифугируют при 8000 оборотах в минуту в течение 15 мин. Супернатант (2 мл) смешивают с 2 мл ТБК и кипятят в течение 15 мин. При этом ТБК реагирует с МДА с образованием триметинового комплекса, имеющего розовую окраску. Пробы охлаждают и измеряют экстинкцию при 532 нм против дистиллированной воды. Расчет проводят по формуле:  $ООА (в \%) = (E_o - E_k) / E_o * 100\%$ , где  $E_o$  и  $E_k$  - экстинкции соответственно опытной и контрольной проб.

ОАА определяют по степени ингибирования ферум-аскорбатиндуцированного окисления твина-80 до МДА. Реагенты: 1% водный раствор твина-80; 1 мМ водный раствор сульфата двухвалентного железа ( $FeSO_4$ ); 10 мМ водный раствор аскорбиновой кислоты; 40% ТХУ; 0,25% водный раствор ТБК. Как описано выше, вносят по 2 мл твина-80, 0,2 мл раствора сульфата железа, 0,2 мл раствора аскорбиновой кислоты, 0,1 мл сыворотки, в контрольную пробу - соответствующее количество дистиллированной воды. Смесь инкубируют 48 ч при 40°C, затем прибавляют 1 мл ТХУ и обрабатывают пробы, как описано выше. Расчет проводят по формуле:  $ОАА (в \%) = (E_k - E_o) / E_k * 100\%$ , где  $E_k$  и  $E_o$  - экстинкции соответственно контрольной и опытной проб.

Для суждения о дисбалансе антиоксидантной и оксидантной систем определяют оксидантный индекс (ОИ). Формула расчета:  $ОИ = ООА / ОАА$ .

К недостаткам известного способа оценки общего оксидантного статуса организма относится его длительность (72 часа), необходимость расходования значительных 5 объемов анализируемой сыворотки или плазмы крови.

Технический результат, обеспечиваемый изобретением, заключается в уменьшении до 20 раз количества анализируемой сыворотки или плазмы в сравнении со стандартной методикой, в сокращении времени проведения анализа с 72 часов до 2 10 часов. При масштабировании можно провести анализ более 500 проб за один день, используя микропланшеты и микропланшетные спектрофотометры. Способ прост в исполнении, экономичен и не требует большого объема термостатируемых камер.

Технический результат достигается тем, что в способе оценки общего оксидантного статуса организма путем определения общей оксидантной активности и общей 15 антиоксидантной активности с последующим определением оксидантного индекса (ОИ), согласно изобретению общую оксидантную активность определяют по степени окисления эхинохрома А компонентами оксидантной системы сыворотки или плазмы крови, а общую антиоксидантную активность определяют по степени окисления 20 эхинохрома А хлорамином В, добавленного к сыворотке или плазме крови.

Предлагаемый способ оценки общего оксидантного статуса основывается на определении общей оксидантной и общей антиоксидантной активности сыворотки или плазмы крови теплокровных организмов с понижением специфической оптической 25 плотности индикаторов - растворов красителей, неустойчивых к окислению.

При определении общей оксидантной активности (ООА) в качестве индикатора используется краситель, например эхинохром А, окисляемый компонентами оксидантной системы теплокровных организмов.

Эхинохром А - пигмент плоского морского ежа *Scaphechinus mirabilis*, который 30 используется в качестве активной субстанции лекарственных препаратов серии «Гистохром» [RU 2352554 C1, 20.04.2009].

Общая антиоксидантная активность (ОАА) определяется по степени разрушения окислителя, подобранного для данного индикаторного красителя, например по разрушению хлорамина В, подобранного для эхинохрома А.

Показатель ОИ здоровых доноров принят за единицу. Значение ОИ больше единицы свидетельствует о дисбалансе общего оксидантного статуса организма.

Изобретение иллюстрируется следующими примерами:

Пример 1.

А) Определение общей оксидантной активности (ООА).

Реагенты: PBS (10 мМ фосфата натрия, 150 мМ NaCl, pH 7,6), 50 γ/мл PBS эхинохром А. На планшет переносят по 50 мкл сыворотки или плазмы крови (в контрольные пробы по 50 мкл PBS), 100 мкл PBS, 50 мкл раствора эхинохрома А и 45 измеряют экстинкцию при 475 нм. Затем смесь инкубируют 30 мин при 37°C и повторяют спектрофотометрирование. Расчет производят по формуле:  $ООА (\%) = (E_1 - E_2) / K * 100\%$ , где  $E_1$  и  $E_2$  - экстинкции проб при первом и втором измерениях,  $K=0,27$ , при этом поглощение контрольной пробы при первом измерении равно 0,427.

Б) Определение общей антиоксидантной активности (ОАА).

Реагенты: 30 γ/мл dH<sub>2</sub>O хлорамином В, PBS (10 мМ фосфат натрия, 150 мМ NaCl, pH 7,6), 50 γ/мл PBS эхинохром А. На планшет переносят по 50 мкл сыворотки или плазмы крови (в контрольные пробы - 50 мкл PBS), 50 мкл хлорамина В (во 2 50 контрольную пробу - 50 мкл PBS). Смесь инкубируют 30 мин при 37°C, затем

добавляют 50 мкл PBS, 50 мкл эхинохрома А и измеряют экстинкцию при 475 и 700 нм. Затем смесь инкубируют 30 мин при 37°C и повторяют спектрофотометрирование. Расчет производят по формуле:  $ОАА (\%) = (E_0 - E_{\min}) / (E_{\max} - E_{\min}) * 100\%$ , где  $E_{\max}$ ,  $E_{\min}$ ,  $E_0 = E_2 - E_1$  - экстинкции соответственно контрольной и опытной проб.

Пример 2. Определение оксидантного статуса у пациентов с ишемической болезнью сердца и неспецифическим язвенным колитом.

Нами обследовано 8 больных со стенокардией напряжения 2 ФК, 2 пациента с инфарктом миокарда (ИМ) и 10 - с неспецифическим язвенным колитом (НЯК).

Контрольную группу составили 6 практически здоровых лиц.

Оценка общего оксидантного статуса проводилась с использованием 2 способов - известного и предлагаемого. Результаты исследования приведены в таблице. Для более удобного представления результатов значения ООА и ОАА выразили в условных единицах, приняв показатели здоровых доноров за единицу.

У пациентов с НЯК и с ИМ не отмечено достоверных различий ООА и ОАА по сравнению с контрольной группой при использовании методики-прототипа, тогда как у больных со стенокардией напряжения 2 ФК отмечается повышение уровня ООА до  $1,43 \pm 1,14$  и снижение уровня ОАА до  $0,76 \pm 0,33$ .

При использовании предлагаемого способа оценки общего оксидантного статуса организма отмечается увеличение уровня ООА и снижение уровня ОАА в исследуемых группах по сравнению с контрольной группой. Причем в группе больных с ИМ уровень ООА выше, чем в группе больных со стенокардией напряжения 2 ФК, а уровень ОАА в 2 раза ниже.

Для суждения о дисбалансе антиоксидантной и оксидантной систем определялся оксидантный индекс (ОИ). Формула расчета:  $ОИ = ООА / ОАА$ .

В группах больных с НЯК и со стенокардией напряжения 2 ФК при использовании стандартного способа определения общего оксидантного статуса ОИ составил  $1,05 \pm 3,71$  и  $1,88 \pm 1,48$  соответственно, в группе больных с ИМ достоверных различий не обнаружено. При использовании предлагаемого способа отмечается повышение ОИ во всех исследуемых группах по сравнению с контрольной, особенно в группе больных с ИМ (ОИ выше в 3 раза и составляет 3,15). Представленные в таблице результаты по способу-прототипу и по предлагаемому способу совпадают не полностью. Это связано с тем, что по стандартной методике определяют конечный продукт (МДА), тогда как предлагаемая методика позволяет определить весь комплекс высоко- и низкомолекулярных соединений (малоновый диальдегид, супероксиддисмутаза, каталаза и т.д.).

Группы исследуемых пациентов	ООА		ОАА		ОИ	
	Прототип	Предлагаемый способ	Прототип	Предлагаемый способ	Прототип	Предлагаемый способ
Здоровые	$1,00 \pm 0,61$	$1,00 \pm 0,21$	$1,00 \pm 0,12$	$1,00 \pm 0,04$	$1,00 \pm 0,56$	$1,00 \pm 0,21$
НЯК	$0,90 \pm 0,55$	$1,36 \pm 0,31$	$0,86 \pm 0,32$	$0,85 \pm 0,06$	$1,05 \pm 3,71$	$1,60 \pm 0,40$
Стенокардия напряжения 2 ФК	$1,43 \pm 1,14$	$1,07 \pm 0,11$	$0,76 \pm 0,33$	$0,93 \pm 0,02$	$1,88 \pm 1,48$	$1,16 \pm 0,13$
ИМ	$0,97 \pm 0,24$	$1,32 \pm 0,06$	$0,90 \pm 0,21$	$0,42 \pm 0,01$	$1,07 \pm 0,53$	$3,15 \pm 0,22$

### Формула изобретения

Способ оценки общего оксидантного статуса организма путем определения общей оксидантной активности и общей антиоксидантной активности с последующим определением оксидантного индекса, отличающийся тем, что общую оксидантную активность определяют по степени окисления эхинохрома А компонентами

оксидантной системы сыворотки или плазмы крови, а общую антиоксидантную активность определяют по степени окисления эхинохрома А хлорамином В, добавленного к сыворотке или плазме крови.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50