



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2010118051/15, 05.05.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
05.05.2010

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 05.05.2010

(43) Дата публикации заявки: 10.11.2011 Бюл. № 31

(45) Опубликовано: 27.07.2012 Бюл. № 21

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: БОРИСОВ С.А. и др. **Функциональная активность фагоцитов легких и состояние микроокружения в очаге воспаления у больных хронической обструктивной болезнью легких// Сибирский консилиум. - 2004, №2(32), с.57-61. ФЕДОРОВ Г.Н., ЛЕОНОВ С.Д. Особенности хемилюминесценции цельной разведенной крови// Электронный математический и медико-биологический (см. прод.)**

Адрес для переписки:

440035, г.Пенза, ул. Ленинградская, д.1,
кв.12, Т.А. Дружининой

(72) Автор(ы):

**Дружинина Татьяна Анатольевна (RU),
Левашова Ольга Анатольевна (RU)**

(73) Патентообладатель(и):

Государственное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования "Пензенский институт усовершенствования врачей Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию Российской Федерации" (RU)

(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РЕЗЕРВА РЕАКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ (ОКСИДАНТНОГО ПОТЕНЦИАЛА)

(57) Реферат:

Изобретение относится к биологии, медицине, в частности к лабораторной диагностике, иммунологии, и описывает способ определения резерва реактивности (оксидантного потенциала) нейтрофилов, в котором проводят измерение светосуммы спонтанной хемилюминесценции цельной разведенной крови в растворе люминола сразу после взятия крови и через 4 часа после ее инкубации, затем проводят расчет разности светосуммы (РСС) как разность измерений через 4 часа и измерения, проведенного сразу после забора крови, при этом за норму значений РСС принимают 1%-99% процентильный интервал общего диапазона

значений контрольной группы здоровых доноров; значения РСС ниже 1% процентильного интервала свидетельствуют о снижении резерва реактивности нейтрофилов, значения, превышающие 99% процентильный интервал, свидетельствуют о процессе оксидантного стресса, альтерации клеток и развитии воспалительно-деструктивного процесса. Данное изобретение позволяет оценить функциональную активность нейтрофилов (феномен деактивации и гиперактивации) без применения микробной тест-культуры, что упрощает проведение исследований и не требует подбора этиотропной микробной культуры, поскольку изменение ХЛ происходит под воздействием

эндогенных субстанций, включая воздействие конкретного больного. 2 пр.
микроорганизмов и их дериватов у

(56) (продолжение):

журнал. - 2007, Т.6, Вып 4. ЗАСЛАВСКАЯ М.И., ИВАНОВА И.П. Влияние некогерентного импульсного излучения на реактивность нейтрофилов крови. Актуальные проблемы биологии, медицины и экологии. Сборник научных работ. - Томск: 2004. Найдено из Интернета [12.07.2011], <URL: <http://tele-conf.ru/aktualnyie-problemyi-zhiznedeyatelnosti-zhivotnyih/vliyanie-nekogerentnogo-impulsnogo-izlucheniya-na-reaktivnost-neytrofilov-krovi-kryis.html>>. Tono-oka T. et al. Chemiluminescence of whole blood. II. Application to clinical examination of phagocytic functions of whole blood from various types of disease. Clin Immunol Immunopathol. 1983 Dec; 29(3):333-40. Abstract.

R U 2 4 5 7 4 8 8 C 2

R U 2 4 5 7 4 8 8 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2010118051/15, 05.05.2010**(24) Effective date for property rights:
05.05.2010

Priority:

(22) Date of filing: **05.05.2010**(43) Application published: **10.11.2011 Bull. 31**(45) Date of publication: **27.07.2012 Bull. 21**

Mail address:

**440035, g.Penza, ul. Leningradskaja, d.1, kv.12,
T.A. Druzhininoj**

(72) Inventor(s):

**Druzhinina Tat'jana Anatol'evna (RU),
Levashova Ol'ga Anatol'evna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Gosudarstvennoe obrazovatel'noe uchrezhdenie
dopolnitel'nogo professional'nogo obrazovanija
"Penzenskij institut usovershenstvovanija
vrachej Federal'nogo agentstva po
zdravookhraneniju i sotsial'nomu razvitiju
Rossijskoj Federatsii" (RU)**(54) **METHOD FOR EVALUATING NEUTROPHIL REACTIVITY RESERVE (OXIDANT POTENTIAL)**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: it involves measuring light sum of spontaneous chemoluminescence of whole diluted blood in a luminole solution immediately after blood sampling and 4 hours after incubation; then the light sum difference (LSD) is calculated as the difference of the measurement 4 hours later and the measurement immediately after blood sampling; a normal LSD is stated to be 1%-99% percentile interval of total range of the control reference of healthy donors; the LSD values lower than 1% percentile interval testifies to a lower neutrophil

reactivity reserve, while the values exceeding 99% percentile interval shows an oxidative stress process, cell alteration and developing inflammation-destructive process.

EFFECT: method enables evaluating functional neutrophil activity without applying microbial test culture that simplifies examinations and requires no selection of etiotropic microbial culture as the "XJI" variation is observed under endogenic substances, including exposure of microorganisms and their derivatives in a specific patients.

2 ex

Изобретение относится к биологии, медицине, в частности к лабораторной диагностике, иммунологии, и может быть использовано для оценки реактивности нейтрофилов (оксидантного потенциала) у больных с гнойно-воспалительными заболеваниями (ГВЗ).

5 Известен ряд способов оценки резерва реактивности нейтрофилов под влиянием различных экзогенных стимулов: микробных тест-культур, частиц латекса инертных или нагруженных бактериальными антигенами и т.д. [1]. Наиболее близкий способ - прогнозирование неблагоприятного течения флегмоны при определении спонтанной
10 хемилюминесценции (ХЛ) сразу и через 2 часа после инкубации крови с культурой стафилококка [2]. Однако трактовка результатов весьма затруднительна, поскольку помимо изменения собственного потенциала клеток, происходит воздействие экзогенного стафилококка, кроме того, предлагается определять дополнительно
15 активность ингибиторов трипсина и холинэстеразы. Аналогом наших исследований является работа С.А. Борисова, в которой проводятся исследования окислительно-метаболической функции и реактивности мигрирующих в крови и тканевых нейтрофилов [3].

Предложен метод оценки резерва реактивности нейтрофилов (оксидантного
20 потенциала). Проводят определение разности светосумм (РСС) спонтанной хемилюминесценции (ХЛ) цельной разведенной крови, измеренной сразу после взятия крови и через 4 часа. Данный временной интервал установлен как допустимый при экспозиции крови *in vitro* до проведения исследований [4]. Известно, что основной
25 вклад в ХЛ цельной разведенной крови вносят нейтрофильные гранулоциты [5]. За норму значений РСС принят 1%-99% процентильный интервал общего диапазона значений контрольной группы здоровых доноров, который составил: 1% - 0,95 у.е.,
30 99% + 10,37 у.е. Значения РСС ниже 1% процентильного интервала у больных с ГВЗ наблюдали в 28,6% случаев, что свидетельствовало о снижении резерва реактивности нейтрофилов вследствие ряда факторов (гиперактивация микробными антигенами *in vivo*, деактивация вследствие недостатка гуморальных активационных или повышении
35 супрессорных факторов). Значения РСС, превышающие 99% процентильный интервал были выявлены в 26,8%, что обусловлено процессом оксидантного стресса, альтерацией клеток и развитием воспалительно-деструктивного процесса. Это
40 является одним из механизмов патогенеза у больных с тяжелыми ГВЗ и обуславливает формирование вторичного иммунодефицитного состояния. Оценка РСС позволяет оценить реактивность нейтрофилов и проводить соответствующую иммуотропную, противовоспалительную, антиоксидантную терапию.

40 Данный тест имеет определенные преимущества перед индуцированной хемилюминесценцией:

- позволяет исследовать резерв реактивности нейтрофилов без применения микробной тест-культуры, что упрощает проведение исследований;
- не требует подбора этиотропной микробной тест культуры.

45 В настоящее время тест апробирован у больных с различными формами пиодермии, хроническим остеомиелитом, флегмоной.

Пример 1. Больной Б. 24 лет. Диагноз: хронический остеомиелит L5 позвонка, свищевая форма. Спонтанная ХЛ, измеренная сразу после взятия крови, составила 2,3
50 у.е.; через 4 часа после инкубации крови *in vitro* 40,18 у.е, РСС составила +37,88 у.е. Регистрируемый оксидантный стресс весьма характерен для тяжелых форм хронического остеомиелита, поскольку процессы свободнорадикального и перекисного окисления считают одним из звеньев патогенеза этого заболевания.

Пример 2. Больная Ф., 23 лет. Диагноз: Хроническая пиодермия. Длительность заболевания 6 лет.

- Стадия обострения (инфильтраты в области лица с гнойным отделяемым): спонтанная ХЛ, измеренная сразу после взятия крови, составила 33,82 у.е.; через 4 часа после инкубации крови *in vitro* 11,7 у.е.. РСС составила -22,12 у.е.. Отрицательные значения РСС объясняются значительной активацией нейтрофилов микробными антигенами *in vivo* (высокие значения спонтанной ХЛ, измеренной сразу после взятия крови) и отсутствием дополнительного резерва нейтрофилов.

- Стадия ремиссии. Значения РСС составили -2,07. Значения РСС в динамике значительно возросли, однако остаются ниже значений в контрольной группе доноров, что объясняется сохраняющейся у больной деактивацией нейтрофилов и является одной из причин длительного хронического гнойно-воспалительного процесса.

Проведение исследования.

Венозная кровь в объеме 3,0 мл отбирается в пластиковую пробирку с гепарином (из расчета 100 ед/мл). Раствор люминола готовят на диметилсульфоксиде (ДМСО) (17,7 мг лю-минола на 10,0 мл ДМСО). Рабочий раствор люминола готовят из расчета 10,0 мл стерильного физиологического раствора и 0,01 мл люминола, раствор предварительно прогревается в термостате при 37°C. К 2,0 мл рабочего раствора добавляется 100 мкл гепаринизированной крови (коэффициент разведения крови - 21). Исследование крови осуществляется сразу после забора. Измерение светосуммы спонтанной хемилюминесценции проводят на приборе ХЛМ-003 в следующем режиме: время исследования - 10 мин, кювета термостатируемая - 37°C. Дальнейшее хранение крови происходит при комнатной температуре (18-25°C). При истечении 4-х часов кровь перемешивают ресуспендированием, после чего проводят повторное измерение светосуммы спонтанной ХЛ. Расчет разности светосуммы (РСС) проводят как разность измерений через 4 часа и измерения, проведенного сразу после забора крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. Якуба Н.И., Андрушук А.А., Скрипка Л.И., Чернушенко Е.Ф. Способ определения иммунологической реактивности организма. Патент на изобретение №1629848.

2. Юнусходжаев Э., Бажанов Н.Н., Владимиров Ю.А., Шерстнев М.П. и др. Способ прогнозирования неблагоприятного течения флегмоны. Патент на изобретение №1553900.

3. Борисов С.А. Сидорова Л.Д., Цырендоржиев Д.Д. и др. Функциональная активность фагоцитов легких и состояние микроокружения в очаге воспаления у больных хронической обструктивной болезнью легких // Сибирский Консилиум. - 2004. -№.2. - С.57-61.

4. Фархутдинов Р.Р. Исследование хемилюминесценции биологического материала и оценка антиокислительной активности на приборе ХЛМ -003. Методические рекомендации. Уфа, 2005, 24 с.

5. Земсков В.М. Хемилюминесценция крови. Методические рекомендации. 1988.

Формула изобретения

Способ определения резерва реактивности (оксидантного потенциала) нейтрофилов, характеризующийся тем, что проводят измерение светосуммы спонтанной хемилюминесценции цельной разведенной крови в растворе люминола сразу после взятия крови и через 4 ч после ее инкубации, затем проводят расчет

разности светосуммы (PCC) как разность измерений через 4 ч и измерения, проведенного сразу после забора крови, при этом за норму значений PCC принимают 1-99% процентильный интервал общего диапазона значений контрольной группы здоровых доноров; значения PCC ниже 1% процентильного интервала свидетельствуют о снижении резерва реактивности нейтрофилов, значения, превышающие 99% процентильный интервал, свидетельствуют о процессе оксидантного стресса, альтерации клеток и развитии воспалительно-деструктивного процесса.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50