



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

(21)(22) Заявка: 2010126241/15, 25.06.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
25.06.2010

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 25.06.2010

(45) Опубликовано: 10.12.2011 Бюл. № 34

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: ПЕТРОВИЧ Ю.А. и др. Интегральный коэффициент, характеризующий свободнорадикальное окисление и антиоксидантную защиту, и новый «остаточный» коэффициент, отражающий результативность применения антиоксидантов при пародонте. - Стоматология, 2001, №1, с.38-41. RU 2186592 С1, 10.08.2002. WO 02103036 А1, 2002.12.27. GRAF WD et al. Comparison (см. прод.)

Адрес для переписки:

350063, г.Краснодар, ул. Седина, 4, КГМУ,  
гл. патентоведу Т.А. Дорониной

(72) Автор(ы):

Басов Александр Александрович (RU),  
Павлюченко Иван Иванович (RU),  
Быков Илья Михайлович (RU),  
Федосов Сергей Ростиславович (RU),  
Губарева Елена Александровна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Кубанский государственный медицинский университет" (ГОУ ВПО КГМУ) (RU),  
Басов Александр Александрович (RU),  
Павлюченко Иван Иванович (RU),  
Быков Илья Михайлович (RU),  
Федосов Сергей Ростиславович (RU),  
Губарева Елена Александровна (RU)

**(54) СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ НАРУШЕНИЙ МЕТАБОЛИЗМА В ОРГАНИЗМЕ В УСЛОВИЯХ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА**

(57) Реферат:

Предлагаемое изобретение относится к медицине и может быть использовано для диагностики дисбаланса функционирования ферментов антирадикальной защиты. Сущность изобретения: в комплексе определяют активность супероксиддисмутазы (СОД<sub>i</sub>) и каталазы (КАТ<sub>i</sub>) в гемолизате, оценивают изменение этих показателей относительно нормы, которая соответствует значениям СОД<sub>k</sub>=0,16±0,02 и КАТ<sub>k</sub>=115,55±9,41. При значении соотношения этих показателей, равном 1,000±0,002, определяют отсутствие дисбаланса функционирования ферментов антирадикальной защиты, а при других значениях дополнительно определяют степень выраженности окислительного стресса

по максимуму и площади вспышки хемилюминесценции. Далее оценивают дисбаланс функционирования ферментов антирадикальной защиты, вычисляя показатель ИПФФАРЗ<sub>i</sub> по формуле. При значении ИПФФАРЗ<sub>i</sub> ниже 70,0 ед. определяют недостаточность каталазы, а при значении ИПФФАРЗ<sub>i</sub> выше 130,0 ед. определяют недостаточность супероксиддисмутазы. Использование способа дает возможность оценить функционирование исследуемых ферментов, что позволяет проводить диагностику заболеваний, сопровождающихся окислительным стрессом, а также способ позволяет определять индивидуальный подход к медикаментозной коррекции. 4 табл., 4 ил.

(56) (продолжение):

of erythrocyte antioxidant enzyme activities and embryologic level of neural tube defects. Eur. J. Pediatr. Surg. 1995, Dec; 5 Suppl 1:8-11. реф. Найдено из БД PubMed PMID: 8770569.

R U 2 4 3 6 1 0 1 C 1

R U 2 4 3 6 1 0 1 C 1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2010126241/15, 25.06.2010**(24) Effective date for property rights:  
**25.06.2010**

Priority:

(22) Date of filing: **25.06.2010**(45) Date of publication: **10.12.2011 Bull. 34**

Mail address:

**350063, g.Krasnodar, ul. Sedina, 4, KGMU, gl.  
patentovedu T.A. Doroninoj**

(72) Inventor(s):

**Basov Aleksandr Aleksandrovich (RU),  
Pavljuchenko Ivan Ivanovich (RU),  
Bykov Il'ja Mikhajlovich (RU),  
Fedosov Sergej Rostislavovich (RU),  
Gubareva Elena Aleksandrovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Gosudarstvennoe obrazovatel'noe uchrezhdenie  
vysshego professional'nogo obrazovanija  
"Kubanskij gosudarstvennyj meditsinskij  
universitet" (GOU VPO KGMU) (RU),  
Basov Aleksandr Aleksandrovich (RU),  
Pavljuchenko Ivan Ivanovich (RU),  
Bykov Il'ja Mikhajlovich (RU),  
Fedosov Sergej Rostislavovich (RU),  
Gubareva Elena Aleksandrovna (RU)**(54) **DIAGNOSTIC TECHNIQUE FOR METABOLIC DISORDERS IN BODY IN OXIDATIVE STRESS ENVIRONMENT**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: hemolysate superoxide dismutase (SODi) and catalase (CATi) activity is determined in a complex; variations of these values are assessed with respect to a reference which relates to the values  $SODk=0,16\pm 0,02$  and  $CATk=115.55\pm 9.41$ . If these values are related as  $1.000\pm 0.002$ , the absence of function imbalance of antiradical protection enzymes is stated, and for the other values - a manifestation rate of oxidative stress and a chemoluminescence burst area is determined in addition to the maximum. Further, function

imbalance of antiradical protection enzymes are assessed by an index of function imbalance of antiradical protection enzymes IFIAREi by formula. At the IFIAREi value is lower than 70.0 units, catalase insufficiency is determined, and if the IFIAREi value is more than 130.0 units, superoxide dismutase insufficiency is determined.

EFFECT: use of the method gives the chance assessing functions of the analysed enzymes that allows diagnosing the diseases accompanied by oxidative stress, the technique allows assessing an individual approach to drug-induced correction.

4 tbl, 2 ex, 4 dwg

Предлагаемое изобретение относится к медицине и может быть использовано в диагностике заболеваний, сопровождающихся окислительным стрессом при дисбалансе функционирования ферментов антирадикальной защиты.

Нарушение функционирования ферментов антирадикальной защиты (ФАРЗ) является одним из значимых показателей диагностики окислительного стресса и контроля за лечением антиоксидантными средствами при многих заболеваниях - сахарный диабет, астма, стенокардия, инфаркт миокарда, катаракта, злокачественные новообразования, ревматоидный артрит и другие [Кулинский В.И. Активные формы кислорода и оксидативная модификация макромолекул: польза, вред и защита. // Соросовский образовательный журнал. - 1999. - №1. - С.2-8]. При этом нередко ключевым механизмом, способствующим формированию окислительного стресса, является развитие дисбаланса в работе ферментов первой и второй линий антирадикальной защиты - супероксиддисмутазы и каталазы [Дубинина Е.Е., Ефимова Л.Ф., Софронова Л.Н., Геронимус А.Л. Сравнительный анализ активности супероксиддисмутазы и каталазы эритроцитов и цельной крови у новорожденных детей при хронической гипоксии. // Лаб. дело. - 1988. - №8. - С.16; Владимиров Ю.А. Свободные радикалы в биологических системах. // Соросовский образовательный журнал. - 2000. - №12. - С.13-19; Gurer Orhan H., Sabir H.U., Ozgunes H. Correlation between clinical indicators of lead poisoning and oxidative stress parameters in controls and lead-exposed workers // Toxicology. - 2004, - Vol.195, N2-3. - P.147-154].

Своевременная диагностика и коррекция нарушений в работе ферментного звена антиоксидантной системы требует четко сформулированных критериев, разграничивающих адаптивную напряженность ФАРЗ, их регуляторные разнонаправленные изменения [Байляк М., Господарев Д., Семчишин Г., Луцак В. - Ингибирование каталазы аминотриазолом *in vivo* приводит к снижению активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в клетках *Saccharomyces cerevisiae*. - Биохимия. - 2008. - Том 73, вып.4. - С.515-523] и наличие дисбаланса в работе этих ферментов, приводящее к формированию окислительного стресса.

Известен способ выявления дисбаланса ферментов антиоксидантной защиты - «Показатель отношения Глутатионпероксидазы / Супероксиддисмутазы» [Сукоян Г.В., Андриадзе Н.А., Варазанашвили Н.А., Чикобава Е.А., Отаришвили И.О., Головач И.В., Митьковская Н.П., Карсанов Н.В. // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. - 2001. - №2. - С.34-40], основанный на определении активности глутатионпероксидазы и супероксиддисмутазы как показателей ферментного звена антиоксидантной системы, с последующим вычислением отношения активности глутатионпероксидазы и супероксиддисмутазы.

Ход определения: активность СОД определяют на основе метода В.Г.Мхитарян, Г.Е.Бадалян [Мхитарян В.Г., Бадалян Г.Е. Влияние пероксидированных и непероксидированных ненасыщенных жирных кислот на активность супероксиддисмутазы. Журнал экспериментальной и клинической медицины. - 1978. - №6. - С.7-11]; активность глутатионпероксидазы - по методу E. Beutler [Beutler E. Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods. - New York, 1973. - P.74], методом Oshino и соавт. [Oshino N, Chance B, Sies H, Bücher T. The role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation in perfused rat liver and the reaction of catalase compound I and hydrogen donors. Biochem 1973; 154: 117-131].

Показатель отношения ГП/СОД рассчитывают по формуле 1:

ГП/СОД = активность ГП/активность СОД (формула 1),

где ГП/СОД - отношение активности глутатионпероксидазы и активности

супероксиддисмутазы.

Результаты оценивают следующим образом: среднестатистическая величина ГП/СОД, полученная в контрольной группе, будет равна 13,5; состояние, при котором значения антиоксидантного индекса (АОИ) выше 13,5, рассматривают как дисбаланс работы ферментов, чувствительный тест ишемии и реперфузии.

Недостатки:

а) использование в способе «Показатель отношения

Глутатионпероксидазы/Супероксиддисмутазы» результатов исследования активности ферментов без учета содержания субстратов, катализируемых ими реакций или содержания продуктов этих реакций приводит к снижению его достоверности и затрудняет трактовку данного показателя, что связано с широкой вариабельностью изменения активности этих ферментов как в сторону повышения, так и в сторону понижения, даже в условиях одной патологии, например в случаях активации ферментов при недостатке субстрата или обратном ингибировании ферментов продуктами катализируемых ими реакций;

б) использование в качестве одной из составляющих в «Показателе отношения Глутатионпероксидазы/Супероксиддисмутазы» активности митохондриальной глутатионпероксидазы уменьшает возможность широкого его использования в клинике, особенно при поражении тканей с исходно невысокой активностью глутатионпероксидазы, что может затруднять трактовку полученных результатов;

в) трудоемким представляется забор биоматериала, необходимого для исследования активности глутатионпероксидазы непосредственно в тканях, поскольку наибольшая ее активность выявлена в миокарде, мозговой ткани, легких, мышцах, глазах [Давыденкова Е.Ф., Шафран М.Г. Атеросклероз и процесс перекисного окисления липидов. // Вест. АМН СССР. - 1989. - №3. - С.10-18], в свою очередь забор в качестве образцов для лабораторных исследований эритроцитов крови может приводить к снижению достоверности получаемых результатов.

За ближайший аналог принят интегральный коэффициент, характеризующий свободнорадикальное окисление (СРО) и антиоксидантную защиту (АОЗ) слюны [Петрович Ю.А., Лемецкая Т.И., Пузин М.Н., Сухова Т.В. Интегральный коэффициент, характеризующий свободнорадикальное окисление и антиоксидантную защиту, и новый «остаточный» коэффициент, отражающий результативность применения антиоксидантов при пародонтите. // Стоматология, 2001, №1, с.38-41], позволяющий выявлять дисбаланс факторов свободнорадикального окисления и антиоксидантной защиты слюны, основанный на определении активности ферментов 1-й и 2-й линии антирадикальной защиты и интенсивности свободнорадикального окисления. Для его осуществления проводят определение уровня малонового диальдегида здоровых и больных (МДАз и МДАб), максимальной амплитуды хемилюминесценции здоровых и больных (МХЛз и МХЛб), периода, в течение которого интенсивность хемилюминесценции достигает полуамплитуды максимальной вспышки у здоровых и больных (ППХЛз и ППХЛб), активности глутатионпероксидазы здоровых и больных (ГПОз и ГПОб), активности супероксиддисмутазы, с последующим делением прооксидантных показателей на антиоксидантные.

Объектом исследования служила смешанная слюна здоровых и больных людей. Пробы слюны центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин. Исследовали супернатант. О показателях СРО судят по максимальной амплитуде хемилюминесценции (МХЛ), которую регистрируют фотоэлектронным множителем

после введения раствора сульфата железа, также по периоду, в течение которого интенсивность хемилюминесценции достигает полуамплитуды максимальной вспышки (ППХЛ), и по уровню МДА, который определяют с помощью стандартной методики [Гаврилов В.Б., Гаврилова А.Р., Мажуль Л.М. Анализ методов определения продуктов перекисного окисления сыворотки крови по тесту с тиобарбитуровой кислотой. *Вопр. мед. химии.* 1987. - Т.33, №1. - С.118-122]. Антиоксидантный потенциал оценивают по активности глутатионпероксидазы (ГПО) по методам [Терехина Н.А., Петрович Ю.А. Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная система (теория, клиническое применение, методы). Пермь, 1992, 34 с., Ravin HA. An improved colorimetric enzymatic assay of ceruloplasmin. *J Lab Clin Med* 1961; S8:1:161-168] и активность супероксиддисмутазы (СОД) по [Терехина Н.А., Петрович Ю.А. Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная система (теория, клиническое применение, методы). Пермь, 1992; 34], определение которых основано на изменении экстинкции опытного раствора в спектрофотометре.

Расчет проводят по формуле 2:

$$AOK = \frac{(MDA_6:MDA_3) \cdot (MHL_6:MHL_3) \cdot (PPHL_6:PPHL_3)}{[(SOD_6:SOD_3) \cdot (GPO_6:GPO_3)]}$$

(формула 2)

Чем ниже было значение антиоксидантного коэффициента (АОК) по сравнению с показателями донорской группы, принятой за 100%, тем более выраженным считают дисбаланс (окислительный стресс) в системе анти- /прооксиданты организма.

Недостатки:

а) из прооксидантных показателей учитывают только узкоспецифичный конечный продукт перекисаации липидов - МДА, что приводит к снижению достоверности данного метода;

б) отсутствует учет промежуточных продуктов окислительной модификации биологических молекул как липидной (диеновый конъюгат и т.п.), так и другой природы (белковой, нуклеотидной, углеводной), что снижает чувствительность данного метода и приводит к неверному отражению уровня имеющегося окислительного стресса, а следовательно, неадекватному назначению терапии, направленной на его устранение;

в) при расчете данного коэффициента не учитывают возможность разнонаправленного изменения активности ферментов антирадикальной защиты - супероксиддисмутазы (1-я линия антирадикальной защиты) и глутатионпероксидазы (3-я линия антирадикальной защиты), поскольку производство этих ферментов в делителе будет оставаться примерно одной и той же величиной в случаях одновременного снижения активности одного из них при параллельном повышении активности другого, что приведет к неправильной оценке вклада дисбаланса функционирования ферментов антирадикальной защиты в развитие окислительного стресса, например при повышении активности супероксиддисмутазы в два раза и одновременном снижении активности глутатионпероксидазы в два раза производство делителя составит как в норме единицу:

$$(MDA_6:MDA_3) \cdot (MHL_6:MHL_3) \cdot (PPHL_6:PPHL_3) / (1 \cdot 1 = 1)$$

$((MDA_6:MDA_3) \cdot (MHL_6:MHL_3) \cdot (PPHL_6:PPHL_3) / (2 \cdot 0,5 = 1))$ , хотя имеющийся дисбаланс в работе этих ферментов может приводить к накоплению пероксида водорода - продукта реакции дисмутации супероксидного анион-радикала, катализируемого супероксиддисмутазой, а в дальнейшем к образованию и других активных форм кислорода, в том числе при взаимодействии пероксида водорода с металлами переменной валентности (железо и другие) к увеличению содержания в тканях гидроксильного радикала - наиболее токсичного для клеточных структур;

г) исследования проводят в слюне, что не всегда объективно отражает функционирование эндогенных систем в крови и тканях, поскольку большое влияние оказывают условия забора слюны для биохимических исследований (без стимуляции, при стимуляции химическими веществами, сплевыванием в пробирку или с помощью специальных капсул, например Лешли-Красногорского), что может изменять качественный и количественный состав слюны и ротовой жидкости, кроме того, большое влияние могут оказывать стоматологические заболевания на характер получаемой слюны, искажая истинную картину состояния внутренней антиоксидантной системы организма.

Задача - создание комплексного, достоверного и однозначно трактуемого способа интегральной оценки функционирования ферментов антирадикальной защиты в условиях окислительного стресса с помощью показателя, основанного на использовании минимального количества дополнительных специальных лабораторных методов диагностики, позволяющего определять выраженность дисбаланса ферментов антирадикальной защиты в условиях окислительного стресса, своевременно назначать рациональную антиоксидантную терапию в должном объеме и контролировать ее эффективность в процессе лечения; с последующей проверкой в практической медицине вышеизложенных предложений при диагностике и лечении окислительного стресса.

Сущностью изобретения является то, что в комплексе определяют активность супероксиддисмутазы (СОД<sub>i</sub>) и каталазы (КАТ<sub>i</sub>) в гемолизате, далее оценивают изменение этих показателей относительно нормы, которая соответствует значениям СОД<sub>к</sub>=0,16±0,02 и КАТ<sub>к</sub>=115,55±9,41, и при значении соотношения этих показателей, равном 1,000±0,002, определяют отсутствие дисбаланса функционирования ферментов антирадикальной защиты, а при других значениях этого соотношения дополнительно определяют степень выраженности окислительного стресса по максимуму и площади вспышки хемилюминесценции и оценивают дисбаланс функционирования ферментов антирадикальной защиты по формуле 3:

$$\text{ИПФФАРЗ}_i = 100 \cdot (\text{КАТ}_i / \text{КАТ}_k : \text{СОД}_i / \text{СОД}_k) \cdot \frac{\text{ПХЛ}_i / \text{ПХЛ}_k \cdot \text{МВХЛ}_i / \text{МВХЛ}_k}{\text{ПХЛ}_i / \text{ПХЛ}_k \cdot \text{МВХЛ}_i / \text{МВХЛ}_k}, \text{ где}$$
  
(формула 3)

ИПФФАРЗ<sub>i</sub> - интегральный показатель функционирования ферментов антирадикальной защиты обследуемого, в единицах соотношения каталаза/супероксиддисмутаза, ед. соотн. КАТ/СОД,

100 - расчетный коэффициент,

КАТ<sub>i</sub> - активность каталазы гемолизата обследуемого, в единицах активности, ед. акт.,

КАТ<sub>к</sub> - активность каталазы гемолизата контрольной группы, в единицах активности, ед. акт.,

СОД<sub>i</sub> - активность супероксиддисмутазы гемолизата обследуемого, в единицах активности, ед. акт.,

СОД<sub>к</sub> - активность супероксиддисмутазы гемолизата контрольной группы, в единицах активности, ед. акт.,

ПХЛ<sub>i</sub> - площадь хемилюминесценции обследуемого, в единицах площади, ед. пл.,

ПХЛ<sub>к</sub> - площадь хемилюминесценции контрольной группы, в единицах площади, ед. пл.,

МВХЛ<sub>i</sub> - максимум вспышки хемилюминесценции обследуемого, в условных единицах, усл. ед.,

МВХЛ<sub>к</sub> - максимум вспышки хемилюминесценции контрольной группы, в условных единицах, усл. ед.,

при значении ИПФФАРЗі ниже 70,0 ед. соотношения КАТ/СОД определяют недостаточность каталазы, а при значении ИПФФАРЗі выше 130,0 ед. соотношения КАТ/СОД определяют недостаточность супероксиддисмутазы.

Техническим результатом изобретения является:

5 1) интегральная оценка функционирования ключевых ферментов антирадикальной защиты - каталазы и супероксиддисмутазы, с одновременным определением их роли в развитии и формировании окислительного стресса в организме обследуемого;

10 2) использование в качестве критерия выраженности явлений окислительного стресса как максимума вспышки хемилюминесценции, позволяющего определить количество прооксидантных факторов в организме (металлы переменной степени окисления, органические пероксиды и гидропероксиды), так и площади хемилюминесценции, позволяющей определить снижение пролонгированной устойчивости антиоксидантной системы к свободнорадикальным процессам;

15 3) для определения данного интегрального показателя используют доступный биоматериал - эритроциты крови, в которых в достаточном количестве содержится как супероксиддисмутаза, так и каталаза [Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э., Хилл Р., Леман Н. Основы биохимии. // Пер. с англ. - М.: Мир, 1981. - Т.1-3. - 1878 с.; Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы. // Лаб. дело. - 1988. - №1. - С.16], что повышает универсальность  
20 определения и использования данного показателя для клинических исследований при различных заболеваниях;

25 4) применяют приоритетный подход в дифференцированной оценке вклада каждой из составляющих уравнения в получаемый результат при расчете интегрального показателя функционирования ферментов антирадикальной защиты и их роли в развитии окислительного стресса путем возведения отношения каталаза/супероксиддисмутаза в степень показателя произведения максимума и  
30 площади хемилюминесценции, позволяющих определить интенсивности образования супероксидного анион-радикала и пероксида водорода - субстратов для супероксиддисмутазы и каталазы соответственно, с учетом контрольных значений, что позволяет как повысить чувствительность способа, то есть увеличить процент истинно положительных результатов у лиц, страдающих заболеваниями с явлениями  
35 окислительного стресса, вызываемого дисбалансом работы ферментов антирадикальной защиты (когда ПХЛі/ПХЛк·МВХЛі/МВХЛк существенно отличается от показателя 1,0), так и повысить специфичность, то есть уменьшить частоту ложноположительных результатов у обследуемых с произведением  
40 максимума и площади хемилюминесценции, близкой к контрольным значениям (когда ПХЛі/ПХЛк·МВХЛі/МВХЛк стремится к показателю 1,0), таким образом достигается максимально возможная диагностическая эффективность для данного способа определения дисбаланса в системе ферментов антирадикальной защиты (табл.1, табл.2, фиг.1, фиг.2).



Математический анализ диапазона значений интегрального показателя функционирования ферментов антирадикальной защиты в условиях пропорционального разнонаправленного изменения активности каталазы и супероксиддисмутазы при различных уровнях интенсивности свободнорадикальных процессов

Прирост показателя в группе i по отношению к - контролю / Показатель	0% (1)	10% (2)	20% (3)	30% (4)	40% (5)	50% (6)	60% (7)	70% (8)	80% (9)	90% (10)	99% (11)
КАТ i	100	90	80	70	60	50	40	30	20	10	1
КАТ k	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
СОД i	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190	199
СОД k	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
ИПФФАРЗ (при ХЛ в области нормальных значений)	100,0	81,8	66,7	53,8	42,9	33,3	25,0	17,6	11,1	5,3	0,5
ИПФФАРЗ (при повышении ХЛ в 2 раза)	100,0	44,8	19,8	8,4	3,4	1,2	0,4	0,1	0,0	0,0	0,0
ИПФФАРЗ (при повышении ХЛ в 3 раза)	100,0	16,4	2,6	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ИПФФАРЗ (при снижении ХЛ в 2 раза)	100,0	95,1	90,4	85,7	80,9	76,0	70,7	64,8	57,7	47,9	26,6
ИПФФАРЗ (при снижении ХЛ в 4 раза)	100,0	98,8	97,5	96,2	94,8	93,4	91,7	89,7	87,2	83,2	71,8
ИПФФАРЗ (при снижении ХЛ в 10 раз)	100,0	99,7	99,4	99,2	98,9	98,6	98,3	97,9	97,5	96,7	94,5

где ИПФФАРЗ - интегральный показатель функционирования ферментов антирадикальной защиты, ед. соотн. КАТ/СОД, КАТ - каталаза (определяемая как  $КАТ=КАТ_i/КАТ_k$ , где  $КАТ_i$  - активность каталазы гемолизата обследуемого, ед. акт.,  $КАТ_k$  - активность каталазы гемолизата контрольной группы, ед. акт.), СОД - супероксиддисмутаза (определяемая как  $СОД=СОД_i/СОД_k$ , где  $СОД_i$  - активность супероксиддисмутазы гемолизата обследуемого, ед. акт.,  $СОД_k$  - активность супероксиддисмутазы гемолизата контрольной группы, ед. акт.), ХЛ - хемилюминесценция (определяемая как  $ХЛ=ПХЛ_i/ПХЛ_k \cdot МВХЛ_i/МВХЛ_k$ , где  $ПХЛ_i$  - площадь хемилюминесценции обследуемого, ед. пл.,  $ПХЛ_k$  - площадь хемилюминесценции контрольной группы, ед. пл.,  $МВХЛ_i$  - максимум вспышки хемилюминесценции обследуемого, усл. ед.,  $МВХЛ_k$  - максимум вспышки хемилюминесценции контрольной группы, усл. ед.)

На фиг.1 с помощью графиков показано моделирование диапазона значений ИПФФАРЗ в условиях пропорционального изменения снижения активности каталазы и повышения активности супероксиддисмутазы при различных уровнях хемилюминесценции (данные приведены в таблице 1, где ИПФФАРЗ - интегральный показатель функционирования ферментов антирадикальной защиты, ед. соотношения КАТ/СОД, КАТ - каталаза, определяемая как  $КАТ = КАТ_i/КАТ_k$ , где  $КАТ_i$  - активность каталазы гемолизата обследуемого, ед. акт.,  $КАТ_k$  - активность каталазы гемолизата контрольной группы, ед. акт., СОД - супероксиддисмутаза, определяемая как  $СОД=СОД_i/СОД_k$ , где  $СОД_i$  - активность супероксиддисмутазы гемолизата обследуемого, ед. акт.,  $СОД_k$  - активность супероксиддисмутазы гемолизата контрольной группы, ед. акт., ХЛ - хемилюминесценция, определяемая как  $ХЛ=ПХЛ_i/ПХЛ_k \cdot МВХЛ_i/МВХЛ_k$ , где  $ПХЛ_i$  - площадь хемилюминесценции обследуемого, ед. пл.,  $ПХЛ_k$  - площадь хемилюминесценции контрольной группы, ед. пл.,  $МВХЛ_i$  - максимум вспышки хемилюминесценции обследуемого, усл. ед.,  $МВХЛ_k$  - максимум вспышки хемилюминесценции контрольной группы, усл. ед.).

Таблица 2

Математический анализ диапазона значений интегрального показателя функционирования ферментов антирадикальной защиты в условиях снижения активности супероксиддисмутазы при различных уровнях интенсивности свободнорадикальных процессов

Прирост показателя в группе i по отношению к контролю / Показатель	0% (1)	10% (2)	20% (3)	30% (4)	40% (5)	50% (6)	60% (7)	70% (8)	80% (9)	90% (10)
КАТ i	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
КАТ k	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
СОД i	100	90	80	70	60	50	40	30	20	10
СОД k	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
ИПФФАРЗ (снижение активности СОД при ХЛ в области нормальных значений)	100,0	111,1	125,0	142,9	166,7	200,0	250,0	333,3	500,0	1000,0
ИПФФАРЗ (снижение активности СОД при повышении ХЛ в 2 раза)	100,0	152,4	244,1	416,5	771,6	1600,0	3906,3	12345,7	62500,0	1000000,0

где ИПФФАРЗ - интегральный показатель функционирования ферментов антирадикальной защиты, ед. соотн. КАТ/СОД, КАТ - каталаза (определяемая как  $КАТ=КАТ_i/КАТ_k$ , где  $КАТ_i$  - активность каталазы гемолизата обследуемого, ед. акт.,  $КАТ_k$  - активность каталазы гемолизата контрольной группы, ед. акт.), СОД - супероксиддисмутаза (определяемая как  $СОД=СОД_i/СОД_k$ , где  $СОД_i$  - активность супероксиддисмутазы гемолизата обследуемого, ед. акт.,  $СОД_k$  - активность супероксиддисмутазы гемолизата контрольной группы, ед. акт.), ХЛ - хемилюминесценция (определяемая как  $ХЛ=ПХЛ_i/ПХЛ_k \cdot МВХЛ_i/МВХЛ_k$ , где  $ПХЛ_i$  - площадь хемилюминесценции обследуемого, ед. пл.,  $ПХЛ_k$  - площадь хемилюминесценции контрольной группы, ед. пл.,  $МВХЛ_i$  - максимум вспышки хемилюминесценции обследуемого, усл. ед.,  $МВХЛ_k$  - максимум вспышки хемилюминесценции контрольной группы, усл. ед.)

На фиг.2 с помощью графиков показано моделирование диапазона значений ИПФФАРЗ в условиях снижения активности супероксиддисмутазы при различных уровнях хемилюминесценции (данные приведены в таблице 2, где ИПФФАРЗ - интегральный показатель функционирования ферментов антирадикальной защиты, ед. соотношения КАТ/СОД, КАТ - каталаза, определяемая как  $КАТ=КАТ_i/КАТ_k$ , где  $КАТ_i$  - активность каталазы гемолизата обследуемого, ед. акт.,  $КАТ_k$  - активность каталазы гемолизата контрольной группы, ед. акт., СОД - супероксиддисмутаза, определяемая как  $СОД=СОД_i/СОД_k$ , где  $СОД_i$  - активность супероксиддисмутазы гемолизата обследуемого, ед. акт.,  $СОД_k$  - активность супероксиддисмутазы гемолизата контрольной группы, ед. акт., ХЛ - хемилюминесценция, определяемая как

$XЛ = ПХЛ_i / ПХЛ_k \cdot МВХЛ_i / МВХЛ_k$ , где ПХЛ<sub>i</sub> - площадь хемилюминесценции обследуемого, ед. пл., ПХЛ<sub>k</sub> - площадь хемилюминесценции контрольной группы, ед. пл., МВХЛ<sub>i</sub> - максимум вспышки хемилюминесценции обследуемого, усл. ед., МВХЛ<sub>k</sub> - максимум вспышки хемилюминесценции контрольной группы, усл. ед.).

5) Особенностью ферментов антирадикальной защиты и белков, непосредственно взаимодействующих с активными формами кислорода, является их сравнительно повышенная устойчивость к окислительной деструкции [Gutteridge J.M.C., Wilkins S. Copper salt-dependent hydroxyl radical formation. Damage to proteins acting as antioxidants // *Biochim. Biophys. Acta.* - 1983. - V.758. - P.38-41, Halliwell B., Aruoma O.I., Wasil M., Gutteridge J.M.C. The resistents of transferrin and ceruloplasmin to oxidative damage // *Biochem. J.* - 1988. - V.256. - P.311-312, Sharonov B.P., Govorova N.Yu., Lyzlova S.N. Serum protein degradation by hypochlorite // *Biochem. Internat.* - 1989. - V.19, №1. - P.27-35, Salo D.C., Pacifici R.E., Lin S.W., Giulivi C., Davies K.J.A. Superoxide dismutase undergoes proteolysis and fragmentation following oxidative modification and inactivation // *J. Biol. Chem.* - 1990. - V.265, №20. - P.11919-11927]. Но и они оказались ранжированы как в отношении действия конкретного оксиданта, так и по чувствительности к различным концентрациям активных форм кислорода. Например, при изучении влияния некоторых оксидантов на супероксиддисмутазу, каталазу и глутатионпероксидазу наиболее устойчивым оказался первый фермент, а наименее - последний [Aruoma O.I., Halliwell B. Action of hypochlorous acid on the antioxidant protective enzymes superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase // *Biochem. J.* - 1987. - V.248, №3. - P.973-976]. В связи с чем представляется важным для объективной оценки дисбаланса функционирования ферментов антирадикальной защиты в условиях окислительного стресса параллельно с определением активности этих ферментов измерять уровень интенсивности свободнорадикального окисления, в том числе с помощью хемилюминесцентных методов.

Способ осуществляют следующим образом.

Для диагностики дисбаланса функционирования ферментов антирадикальной защиты организма человека используют интегральный показатель функционирования ферментов антирадикальной защиты (ИПФФАРЗ). Объектом исследования служит кровь обследуемых, стабилизированная антикоагулянтами, в которой определяют активность каталазы и супероксиддисмутазы, а также активность свободнорадикальных процессов хемилюминометрическим методом.

Активность каталазы определяют в гемолизате эритроцитов по методу [Beers R., Sizer I. A Spectrophotometric Method for Measuring the Breakdown of Hydrogen Peroxide by Catalase // *J. Biol. Chem.* - 1952. - №195. - P. 133] в модификации [Павлюченко И.И., Луговая И.А., Федосов С.Р., Басов А.А., Быков М.И. Активность ферментов антирадикальной защиты в эритроцитах и в раневом отделяемом у больных с осложненным течением сахарного диабета // XIV международная конференция «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии». - Ялта - Гурзуф, 2006. - С.281-287]. Определение активности каталазы основано на определении скорости утилизации перекиси водорода в реакционной смеси, в которую вносится биологический материал, содержащий фермент. Об интенсивности утилизации перекиси водорода судили по скорости снижения экстинкции при длине волны 260 нм, на которой перекись водорода имеет максимум поглощения. Приготовление гемолизата производилось путем внесения в пробирку с 10 мл дистиллированной H<sub>2</sub>O 50 мкл отмытых эритроцитов. Параллельно ставилась контрольная (без биологического материала) и опытная (в присутствии

исследуемого биологического материала) пробы. В пробирки с опытной и контрольной пробой вносили 0,5 мл 3%  $H_2O_2$  + 2 мл 0,1 М калий-фосфатного буфера (рН 7,4). Затем в пробирки с контрольной пробой добавляли 0,3 мл 50% раствора трихлоруксусной кислоты (для инактивации каталазы перед внесением в контроль раствора пероксида водорода). Подогревали опыт и контроль в течение 10 минут при температуре 37°C. Вносили 200 мкл гемолизата эритроцитов параллельно в опыт и контроль и инкубировали в течение 180 секунд при температуре 37°C в сухом термостате. После окончания инкубации в пробирки с опытной пробой добавляли 0,3 мл 50% раствора трихлоруксусной кислоты и пробирки центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин. Супернатант фотометрировали против 5% раствора трихлоруксусной кислоты при длине волны 260 нм. Полученная экстинкция соответствует содержанию перекиси водорода в супернатанте. Разность в оптической плотности контрольной и опытной проб использовалась для расчета активности каталазы. Расчет активности каталазы производили по разнице экстинкций в опытной и контрольной пробах согласно закону Бугера-Ламберта-Бэра с учетом молярного коэффициента светопоглощения перекиси водорода при длине волны 260 нм  $\epsilon = 22 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  по формуле 4:

$$A = (\Delta E \cdot V_{p.c.} \cdot 10^3 \cdot x) / (V_{пр} \cdot l \cdot \epsilon \cdot t) \quad (\text{формула 4}),$$

где А - активность каталазы, ммоль / (мин·л);

$\Delta E$  - разность экстинкций контрольных и опытных проб;

$V_{p.c.}$  - объем реакционной смеси (3 мл);

$V_{пр}$  - объем пробы, использованной для определения активности КАТ (0,2 мл);

l - длина оптического пути (1 см);

$\epsilon$  - молярный коэффициент светопоглощения  $H_2O_2$ ;

t - время инкубации (3 мин);

x - степень разведения эритроцитарной взвеси в гемолизате.

Полученные результаты активности каталазы делили на количество эритроцитов в использованной взвеси и выражали в условных единицах активности (ед. акт.).

Для определения активности супероксиддисмутазы используют методику [Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.В. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина // Вопросы медицинской химии. - 1990. - №2. - С.88-91] в модификации [Павлюченко И.И., Луговая И.А., Федосов С.Р., Басов А.А., Быков М.И. Активность ферментов антирадикальной защиты в эритроцитах и в раневом отделяемом у больных с осложненным течением сахарного диабета // XIV международная конференция «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии». - Ялта - Гурзуф, 2006. - С.281-287]. Метод основан на способности супероксиддисмутазы ингибировать реакцию аутоокисления кверцетина в связи с тем, что одним из промежуточных продуктов этой реакции является супероксидный анион-радикал. Выполнение методики заключается в определении разницы экстинкций растворов опытной пробы (с биосубстратом) и контрольной пробы (без биосубстрата). Аутоокисление кверцетина (1,4 мкМ) проводили в течение 15 минут при комнатной температуре в 0,015 М фосфатном буфере рН 7,8, содержащем 0,08 мМ этилендиаминтетраацетата и 0,8 мМ тетраметилэтилендиамина в конечном объеме 3,5 мл. Реакцию начинали внесением в среду инкубации кверцетина в 0,1 мл диметилсульфоксида. Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре при 406 нм. Степень ингибирования аутоокисления кверцетина определяли по разнице в оптической плотности опытной и контрольной пробы. Результаты активности

супероксиддисмутазы выражают в единицах активности (ед. акт.), соответствующих степени ингибирования реакции за единицу времени, которую находят по формуле (формула 5):

$$COД = [ (E_{0KOH} - E_{15KOH}) - (E_{0OP} - E_{15OP}) ] / (E_{0KOH} - E_{15KOH}) \quad (\text{формула } 5), \text{ где}$$

5 COД - активность супероксиддисмутазы гемолизата, в единицах активности, ед. акт.,

$E_{0KOH}$  - экстинкция контрольной пробы перед инициацией аутоокисления кверцетина, в единицах оптической плотности, е.о.п.,

10  $E_{15KOH}$  - экстинкция контрольной пробы через 15 минут после инициации аутоокисления кверцетина, в единицах оптической плотности, е.о.п.,

$E_{0OP}$  - экстинкция опытной пробы перед инициацией аутоокисления кверцетина, в единицах оптической плотности, е.о.п.,

15  $E_{15OP}$  - экстинкция опытной пробы через 15 минут после инициации аутоокисления кверцетина, в единицах оптической плотности, е.о.п.

Люминол-зависимая  $H_2O_2$ -индуцированная хемилюминесценция плазмы крови и экссудата раны измерялась на хемилюминотестере ЛТ-1 производства НПО «Люмин» (Ростов-на-Дону) по авторской методике [Павлюченко И.И., Басов А.А., Федосов С.Р. «Система лабораторной диагностики окислительного стресса». Патент на полезную модель №54787 по заявке №2006101586 от 19.01.2006]. В кювету вносили 2,9 мл 50 мкМ раствора люминола в 0,1 М трис-НСI буфере (рН 6,8). Биологический субстрат (плазма крови или раневой экссудат) осаждали 28% трихлоруксусной кислотой в соотношении 1:10 и центрифугированием на 3000 об/с в течение 10 минут. Затем добавляли 100 мкл полученного супернатанта в кювету. Термостатировали кювету с реакционной системой 500 секунд в сухом термостате ( $t = 37^\circ C$ ). После этого кювета помещалась в люминотестер ЛТ-1 и реакция радикального окисления люминола запускалась впрыскиванием с помощью шприца-дозатора через инжектор 0,5 мл 3%  $H_2O_2$ . Интенсивность вспышки хемилюминесценции

30 регистрировалась в условных единицах (у.е.) хемилюминесценции в виде двух параметров: максимум вспышки хемилюминесценции и площадь хемилюминесценции. Изучение динамики процесса хемилюминесценции [Федосов С.Р., Павлюченко И.И., Басов А.А. Способ повышения информативности прибора «Хемилюминотестер ЛТ-1» // Современные проблемы науки и образования. - 2006. - №4 (прил. №1). - С.27-28]

35 производилось с помощью собственного аппаратно-программного комплекса [Пат. 2236008 Российская Федерация. МПК А61К 33/00. Способ лабораторной диагностики окислительного стресса организма человека / Павлюченко И.И., Басов А.А., Федосов С.Р.; заявитель и патентообладатель Павлюченко И.И., Басов А.А., Федосов С.Р. -

40 №2006101586/22; заявл. 19.01.2006; опубл. 27.07.2006 // Бюл. - 2006. - №21. - 2 с.] с программным обеспечением [Свидетельство об официальной регистрации программы для ЭВМ 2006611562. Программа для регистрации сигналов хемилюминотестера ЛТ-1 / Павлюченко И.И., Федосов С.Р., Басов А.А.; заявитель и правообладатель

45 Павлюченко И.И., Федосов С.Р., Басов А.А. - №2006610783; заявл. 16.03.2006; зарег. 10.05.2006], позволяющим оцифровывать аналоговый сигнал с выхода хемилюминотестера ЛТ-1. Определялись следующие показатели хемилюминесценции: максимум вспышки хемилюминесценции в сравнении с эталоном (рабочий раствор люминола) и площадь хемилюминесценции за 25 секунд в сравнении с эталоном

50 (рабочий раствор люминола). В обоих случаях эталоном служила реакционная смесь без биологического образца. Интенсивность реакций свободнорадикального окисления, определяемая с помощью люминол-зависимой хемилюминесценции по максимуму и площади хемилюминесценции, указывает на наличие окислительного

стресса и отражает его уровень.

Полученные результаты трактуют следующим образом.

Чем ниже значения в 100 единиц (соотношение КАТ/СОД) положительный результат ИПФФАРЗ, тем большую роль в развитии окислительного стресса организма играет недостаточность каталазы (второй линии ФАРЗ), чем выше значения 100 единиц (соотношение КАТ/СОД) положительный результат ИПФФАРЗ, тем большую роль в развитии окислительного стресса организма играет недостаточность супероксиддисмутазы (первой линии ФАРЗ), а чем ближе к значению 100,0 условных единиц положительный результат ИПФФАРЗ, тем меньшую роль в развитии окислительного стресса играют ферменты антирадикальной защиты - как каталаза, так и супероксиддисмутаза.

Обоснование достигнутых результатов

Особенность предлагаемого способа заключается в определении дисбаланса функционирования ферментов антирадикальной защиты (каталазы и супероксиддисмутазы) и параллельной оценки их роли в развитии окислительного стресса, выраженность которого оценивают по уровню генерации активных форм кислорода - супероксидного анион-радикала и пероксида водорода, определяемых методом люминол- $H_2O_2$ -зависимой хемилюминесценции с помощью авторской модификации [Павлюченко И.И., Басов А.А., Федосов С.Р. «Система лабораторной диагностики окислительного стресса». Патент на полезную модель №54787 по заявке №2006101586 от 19.01.2006], позволяющей определять как максимум вспышки хемилюминесценции, так и площадь хемилюминесценции.

Помимо эндогенного синтеза, ферменты антирадикальной защиты могут поступать в организм в составе пищевых веществ, фармацевтических препаратов и биодобавок. Супероксиддисмутазу и каталазу нередко используют в виде лекарственных форм при ожоговой болезни, заболеваниях сердечно-сосудистой системы, в хирургической практике, ревматологии, в качестве антитромботических средств, при воспалительных заболеваниях и иммунодефицитных состояниях, в стоматологии [Гайворонская Т.В., Петросян Э.А., Галенко-Ярошевский В.П. Влияние натрия гипохлорита и препаратов супероксиддисмутазы на состояние про-антиоксидантной системы крови при гнойной ране. - Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2007. - Прил.3: 174-177; Гайворонская Т.В. Экспериментальное обоснование эффективности применения непрямого электрохимического окисления крови и антиоксидантной терапии при лечении гнойных ран мягких тканей. - Стоматология. - 2008. - 1: 18-22; Макаревич О.П., Голиков П.П. Активность супероксиддисмутазы крови в острый период различных заболеваний. // Лаб. дело. - 1983. - №6. - С.24-27, Максименко А.В., Тищенко Е.Г. Ковалентная модификация субъединиц супероксиддисмутазы хондроитинсульфатом. // Биохимия. - 1997. - Т. 62. - Вып.10. - 1359-1363, Максименко А.В., Тищенко Е.Г. Модификация каталазы хондроитинсульфатом. // Биохимия. - 1997. - Т.62. - Вып.10. - С.1364-1368, Максименко А.В., Тищенко Е.Г., Голубых В.Л. Антитромботическое действие производных каталазы и хондроитинсульфата при артериальном поражении у крыс. // Вопросы медицинской химии. - 1998. - Т. 44. - Вып.4. - С.362-368, Архипенко Ю.В., Сазонтова Т.Г. Роль про- и антиоксидантных факторов при адаптации к различным видам гипоксии // Кислород и свободные радикалы: материалы международного симпозиума. - Гродно, 1996. - С.7-8., Verckman R., Flohe L. The pathogenetic role of superoxide dismutase. // Bull. Eur. Physiopathol. Respirat. - 1981. - N914. - P.275-285, Blane D.R., Heal N.D., Treby D.A. Protection against hydrogen peroxide in synovial fluid from rheumatoid patients. // Clin. Sci. - 1981. - V.61. -

№4. - P.483-486, McCord J.M. Superoxide radical: controversies, contradictions, and paradoxes // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. - 1995. - V.209. - №2. - P.112-117], кроме того, в настоящее время в медицине используются также имитаторы ферментов антирадикальной защиты [Packer L., Cadenas E. Handbook of Synthetic Antioxidants. - New York: Marcel Dekker, 1996] - все это требует новых надежных и доступных методов диагностики их функционирования для определения показаний к назначению данной группы препаратов и мониторинга эффективности антиоксидантной терапии, проводимой с их использованием.

Проведены исследования состояния баланса каталазы и супероксиддисмутазы крови у различных категорий больных (n>200 чел.).

Анализируя активность каталазы у пациентов с сахарным диабетом и у здоровых людей, можно отметить отсутствие между ними существенного различия. Так, активность каталазы у пациентов с сахарным диабетом составляет  $110,51 \pm 4,82$  ед. акт., а у здоровых людей -  $115,55 \pm 9,41$  ед. акт.

При сравнении активности супероксиддисмутазы у пациентов с сахарным диабетом и у здоровых людей обращает на себя внимание имеющееся между ними различие. Так, активность супероксиддисмутазы у пациентов с сахарным диабетом составляет  $0,097 \pm 0,01$  ед. акт., а у здоровых людей -  $0,159 \pm 0,015$  ед. акт. Активность супероксиддисмутазы у пациентов с сахарным диабетом снижена на 39% от аналогичного показателя у здоровых людей.

Максимум вспышки хемилюминесценции плазмы крови у пациентов с сахарным диабетом составляет  $0,832 \pm 0,086$  усл. ед., а у здоровых людей -  $0,236 \pm 0,021$  усл. ед. Максимум вспышки хемилюминесценции у пациентов с сахарным диабетом превышает аналогичный показатель у здоровых людей в 3,52 раза, что связано с наличием сахарного диабета и нарушениями в системах специфической и неспецифической защиты организма.

Площадь хемилюминесценции плазмы крови у пациентов с сахарным диабетом составляет  $0,978 \pm 0,02$  ед. пл., а у здоровых людей -  $0,723 \pm 0,049$  ед. пл. Площадь хемилюминесценции у пациентов с сахарным диабетом превышает аналогичный показатель у здоровых людей в 1,35 раза, что в первую очередь обусловлено метаболическими расстройствами и снижением защитных механизмов у пациентов, страдающих сахарным диабетом.

С целью увеличения наглядности авторами был произведен расчет ИПФФАРЗ<sub>i</sub> у пациентов с сахарным диабетом. ИПФФАРЗ<sub>i</sub> составил 853,4 ед. соотн. КАТ/СОД, что свидетельствует об имеющем существенное значение для организма снижении активности супероксиддисмутазы у пациентов с сахарным диабетом.

Использование интегрального коэффициента ИПФФАРЗ<sub>i</sub> в сравнении с отдельно взятыми показателями активности каталазы и супероксиддисмутазы позволяет с большей точностью и эффективностью определять состояние ферментативного компонента антиоксидантной системы, что может иметь решающее значение при выборе оптимального метода лечения пациента.

Пример 1. В отделение гнойной хирургии Краевой клинической больницы г.Краснодара 10 июня 2006 года поступил пациент Карагозян М.А., возраст 37 лет. Диагноз: «Сахарный диабет 2 типа, инсулинпотребный, тяжелая форма. Синдром диабетической стопы, нейропатическая форма, глубокая флегмона тыла и подошвы правой стопы». Длительность заболевания сахарным диабетом составляла 8 лет. Проведено обследование с целью диагностирования возможного наличия дисбаланса основных ферментов антирадикальной защиты - каталазы и супероксиддисмутазы.

Активность каталазы была снижена на 13,2% (по сравнению со средним показателем активности каталазы у здоровых людей  $KAT=115,55$  ед. акт.) и составила  $KAT_i=100,27$  ед. акт. Активность супероксиддисмутазы была повышена на 6,3% (по сравнению со средним показателем активности супероксиддисмутазы у здоровых людей  $СОД=0,159$  ед. акт.) и составила  $СОД_i=0,169$  ед. акт. Показатель максимума вспышки хемилюминесценции был повышен в 5,3 раза (по сравнению со средним показателем максимума вспышки хемилюминесценции у здоровых людей  $МВХЛ=0,236$  усл. ед.) и составила  $МВХЛ_i=1,281$  усл. ед. Показатель площади хемилюминесценции был повышен в 3,1 раза (по сравнению со средним показателем площади хемилюминесценции у здоровых людей  $ПХЛ=0,723$  ед. пл.) и составила  $ПХЛ_i=2,224$  ед. пл. У этого пациента ИПФФАРЗ<sub>i</sub> составил 27,7 ед. соотн.  $KAT/СОД$ , что определили как выраженный дисбаланс в сторону преобладания активности супероксиддисмутазы над активностью каталазы.

В течение 20 дней было проведено хирургическое и медикаментозное лечение, в том числе с применением антиоксидантных препаратов (липовой кислоты в стандартной дозировке). После завершения лечения проведено повторное обследование с целью определения динамики изменений вышеуказанных показателей. Активность каталазы была снижена на 11,4% (по сравнению со средним показателем активности каталазы у здоровых людей  $KAT=115,55$  ед. акт.) и составила:  $KAT_i=102,32$  ед. акт. Активность супероксиддисмутазы была снижена на 13,4% (по сравнению со средним показателем активности супероксиддисмутазы здоровых людей  $СОД=0,159$  ед. акт.) и составила:  $СОД_i=0,138$  ед. акт. Показатель максимума вспышки хемилюминесценции был повышен в 4,5 раза (по сравнению со средним показателем максимума вспышки хемилюминесценции у здоровых людей  $МВХЛ=0,236$  усл. ед.) и составил:  $МВХЛ_i=1,083$  усл. ед. Показатель площади хемилюминесценции был повышен в 1,5 раза (по сравнению со средним показателем площади хемилюминесценции у здоровых людей  $ПХЛ=0,723$  ед. пл.) и составил:  $ПХЛ_i=1,065$  ед. пл. После лечения ИПФФАРЗ<sub>i</sub> у данного пациента составил 114,5 ед. соотн.  $KAT/СОД$ , что определили как восстановление физиологической нормы баланса активности каталазы и супероксиддисмутазы, а проведенное лечение оценили как эффективное и адекватное (табл.3, фиг.3).

Таблица 3

Пример динамики ИПФФАРЗ у больного на фоне проведенного комплексного лечения с антиоксидантными средствами

Показатель	$KAT_i$	$KAT_k$	$СОД_i$	$СОД_k$	$МВХЛ_i$	$МВХЛ_k$	$ПХЛ_i$	$ПХЛ_k$	ИПФФАРЗ <sub>i</sub>
До лечения (1)	100,27	115,55	0,169	0,159	1,281	0,236	2,224	0,723	27,7
После проведенного лечения (2)	102,32	115,55	0,138	0,159	1,083	0,236	1,065	0,723	114,5

где ИПФФАРЗ - интегральный показатель функционирования ферментов антирадикальной защиты, ед. соотн.  $KAT/СОД$ ,

$KAT$  - каталаза (определяемая как  $KAT=KAT_i/KAT_k$ , где  $KAT_i$  - активность каталазы гемолизата обследуемого, ед. акт.,  $KAT_k$  - активность каталазы гемолизата контрольной группы, ед. акт.),

$СОД$  - супероксиддисмутазы (определяемая как  $СОД=СОД_i/СОД_k$ , где  $СОД_i$  - активность супероксиддисмутазы гемолизата обследуемого, ед. акт.,  $СОД_k$  - активность супероксиддисмутазы гемолизата контрольной группы, ед. акт.),

$ХЛ$  - хемилюминесценция (определяемая как  $ХЛ=ПХЛ_i/ПХЛ_k \cdot МВХЛ_i/МВХЛ_k$ , где  $ПХЛ_i$  - площадь хемилюминесценции обследуемого, ед. пл.,  $ПХЛ_k$  - площадь хемилюминесценции контрольной группы, ед. пл.,  $МВХЛ_i$  - максимум вспышки хемилюминесценции обследуемого, усл. ед.,  $МВХЛ_k$  - максимум вспышки хемилюминесценции контрольной группы, усл. ед.)

На фиг.3 с помощью графиков показана динамика ИПФФАРЗ у больного сахарным диабетом на фоне проведенного комплексного лечения с антиоксидантными средствами (пример 1, данные приведены в таблице 3, где ИПФФАРЗ - интегральный показатель функционирования ферментов антирадикальной защиты, ед. соотношения  $KAT/СОД$ ,  $KAT$  - каталаза, определяемая как  $KAT=KAT_i/KAT_k$ , где  $KAT_i$  - активность каталазы гемолизата обследуемого, ед. акт.,  $KAT_k$  - активность каталазы гемолизата контрольной группы, ед. акт.,  $СОД$  - супероксиддисмутазы, определяемая как  $СОД=СОД_i/СОД_k$ , где  $СОД_i$  - активность супероксиддисмутазы гемолизата обследуемого, ед. акт.,  $СОД_k$  - активность супероксиддисмутазы гемолизата контрольной группы, ед. акт.,  $ХЛ$  -

хемилюминесценция, определяемая как  $ХЛ=ПХЛі/ПХЛк \cdot МВХЛі/МВХЛк$ , где ПХЛі - площадь хемилюминесценции обследуемого, ед. пл., ПХЛк - площадь хемилюминесценции контрольной группы, ед. пл., МВХЛі - максимум вспышки хемилюминесценции обследуемого, усл. ед., МВХЛк - максимум вспышки хемилюминесценции контрольной группы, усл. ед.).

Пример 2. В отделение гнойной хирургии Краевой клинической больницы г.Краснодара 7 апреля 2006 года поступила пациент Медведева А.А., возраст 62 года. Диагноз: «Пролежневая язва крестцово-копчиковой области. Сахарный диабет 2 типа, легкая форма». Проведено обследование с целью диагностирования возможного наличия дисбаланса основных ферментов антирадикальной защиты - каталазы и супероксиддисмутазы. Активность каталазы была снижена на 5,5% (по сравнению со средним показателем активности каталазы у здоровых людей  $КАТ=115,55$  ед. акт.) и составила:  $КАТі=109,19$  ед. акт. Активность супероксиддисмутазы была снижена на 18,2% (по сравнению со средним показателем активности супероксиддисмутазы у здоровых людей  $СОД=0,159$  ед. акт.) и составила:  $СОДі=0,130$  ед. акт. Показатель максимума вспышки хемилюминесценции был повышен на 38,6% (по сравнению со средним показателем максимума вспышки хемилюминесценции у здоровых людей  $МВХЛ=0,236$  усл. ед.) и составил:  $МВХЛі=0,327$  усл. ед. Показатель площади хемилюминесценции был повышен на 15,9% (по сравнению со средним показателем площади хемилюминесценции у здоровых людей  $ПХЛ=0,723$  ед. пл.) и составил:  $ПХЛі=0,838$  ед. пл. У этого пациента ИПФФАРЗі составил 126,2 ед. соотн.  $КАТ/СОД$ , что определили как клинически незначимый дисбаланс, не требующий специфической терапии.

В течение 12 дней было проведено хирургическое лечение без использования антиоксидантных препаратов. После окончания стационарного лечения проведено повторное обследование с целью определения динамики изменений вышеуказанных показателей. Активность каталазы описываемого пациента практически не отличалась от средних показателей у здоровых людей:  $КАТі=112,55$  ед. акт. Также и активность супероксиддисмутазы была близка к среднему показателю пациентов с сахарным диабетом без гнойного заболевания  $СОДі=0,162$  ед. акт. Показатель максимума вспышки хемилюминесценции был повышен на 26,7% (по сравнению со средним показателем максимума вспышки хемилюминесценции у здоровых людей  $МВХЛ=0,236$  усл. ед.) и составил:  $МВХЛі=0,299$  усл. ед. Показатель площади хемилюминесценции был повышен на 5,4% (по сравнению со средним показателем площади хемилюминесценции у здоровых людей  $ПХЛ=0,723$  ед. пл.) и составил:  $ПХЛі=0,772$  ед. пл. После лечения ИПФФАРЗі у данного пациента составил 95,5 ед. соотн.  $КАТ/СОД$ , что определили как полное восстановление физиологической нормы баланса активности каталазы и супероксиддисмутазы (табл.4, фиг.4). Оценка ИПФФАРЗі позволила отказаться от проведения специфической антиоксидантной терапии и снизить стоимость лечения при сохранении положительного результата лечения.

Таблица 4

Пример динамики ИПФФАРЗ у больного на фоне проведенного лечения без использования антиоксидантных препаратов

Показатель	КАТі	КАТк	СОДі	СОДк	МВХЛі	МВХЛк	ПХЛі	ПХЛк	ИПФФАРЗі
До лечения (1)	109,19	115,55	0,130	0,159	0,327	0,236	0,838	0,723	126,2
После проведенного лечения (2)	112,55	115,55	0,162	0,159	0,299	0,236	0,762	0,723	95,5

где ИПФФАРЗ - интегральный показатель функционирования ферментов антирадикальной защиты, ед. соотн.  $КАТ/СОД$ .

КАТ - каталаза (определяемая как  $КАТ=КАТі/КАТк$ , где КАТі - активность каталазы гемолизата обследуемого, ед. акт., КАТк - активность каталазы гемолизата контрольной группы, ед. акт.),

СОД - супероксиддисмутаза (определяемая как  $СОД=СОДі/СОДк$ , где СОДі - активность супероксиддисмутазы гемолизата обследуемого, ед. акт., СОДк - активность супероксиддисмутазы гемолизата контрольной группы, ед. акт.),

ХЛ - хемилюминесценция (определяемая как  $ХЛ=ПХЛі/ПХЛк \cdot МВХЛі/МВХЛк$ , где ПХЛі - площадь хемилюминесценции обследуемого, ед. пл., ПХЛк - площадь хемилюминесценции контрольной группы, ед. пл., МВХЛі - максимум вспышки хемилюминесценции обследуемого, усл. ед., МВХЛк - максимум вспышки хемилюминесценции контрольной группы, усл. ед.)

На фиг.4 с помощью графиков показана динамика ИПФФАРЗ у больного



сахарным диабетом на фоне проведенного лечения без использования антиоксидантов (пример 2, данные приведены в таблице 4, где ИПФФАРЗ - интегральный показатель функционирования ферментов антирадикальной защиты, ед. соотношения  $KAT/SOD$ ,  $KAT$  - каталаза, определяемая как  $KAT=KATi/KATk$ , где  $KATi$  - активность каталазы гемолизата обследуемого, ед. акт.,  $KATk$  - активность каталазы гемолизата контрольной группы, ед. акт.,  $SOD$  - супероксиддисмутаза, определяемая как  $SOD=SODi/SODk$ , где  $SODi$  - активность супероксиддисмутазы гемолизата обследуемого, ед. акт.,  $SODk$  - активность супероксиддисмутазы гемолизата контрольной группы, ед. акт.,  $XЛ$  - хемилюминесценция, определяемая как  $XЛ=ПХЛi/ПХЛk \cdot MBXЛi/MBXЛk$ , где  $ПХЛi$  - площадь хемилюминесценции обследуемого, ед. пл.,  $ПХЛk$  - площадь хемилюминесценции контрольной группы, ед. пл.,  $MBXЛi$  - максимум вспышки хемилюминесценции обследуемого, усл. ед.,  $MBXЛk$  - максимум вспышки хемилюминесценции контрольной группы, усл. ед.).

Данное изобретение позволяет:

1. Оценить баланс каталазы и супероксиддисмутазы как показателя, демонстрирующего дисфункцию основных ферментов антиоксидантной защиты человеческого организма, что позволит своевременно провести адекватные мероприятия по его медикаментозной коррекции.

2. Провести оценку патобиохимической значимости дисбаланса каталазы и супероксиддисмутазы за счет дополнительной оценки состояния прооксидантной и антиоксидантной систем, что позволит проводить индивидуальную оценку показаний к назначению медикаментозной терапии и сократить дозировки используемых лекарственных препаратов с антиоксидантной активностью, в том числе содержащих ферменты антирадикальной защиты либо их имитаторы, уменьшая тем самым количество возможных побочных эффектов, а также снизить расходы на указанные препараты.

3. Позволяет разработать индивидуальные критерии к подходам коррекции дисбаланса каталазы и супероксиддисмутазы у различных категорий больных, например определять необходимость использования в лечении препаратов на основе супероксиддисмутазы (рексод, орготеин, содерм и другие) и каталазы (на основе липосом), а также имитаторов ферментов антирадикальной защиты, кроме того, данный показатель позволит достоверно оценивать эффективность по восстановлению баланса функционирования ферментов антирадикальной защиты в процессе лечения с целью выполнения своевременной коррекции проводимой терапии.

Практическим результатом предложения является определение дисбаланса основных ферментов антирадикальной защиты у обследуемых больных, а также оценка диагностической значимости выявленных изменений, что позволяет определять индивидуальные показания к медикаментозной коррекции, а значит сократить время пребывания больных в стационарах и ограничить количество необходимых для лечения медикаментов.

#### Формула изобретения

Способ диагностики нарушений метаболизма в организме, вызванных окислительным стрессом, включающий определение активности ферментов 1-й и 2-й линии антирадикальной защиты и интенсивности свободнорадикального окисления, отличающийся тем, что в комплексе определяют активность супероксиддисмутазы ( $SODi$ ) и каталазы ( $KATi$ ) в гемолизате, далее оценивают изменение этих показателей относительно нормы, которая соответствует значениям  $SODk=0,16 \pm 0,02$  и  $KATk=$

115,55±9,41, и при значении соотношения этих показателей равном 1,000±0,002 определяют отсутствие дисбаланса функционирования ферментов антирадикальной защиты, а при других значениях этого соотношения дополнительно определяют степень выраженности окислительного стресса по максимуму и площади вспышки хемилюминесценции и оценивают дисбаланс функционирования ферментов антирадикальной защиты по формуле:

$$\text{ИПФФАРЗ}_i = 100 \cdot (\text{КАТ}_i / \text{КАТ}_k : \text{СОД}_i / \text{СОД}_k) \cdot \text{ПХЛ}_i / \text{ПХЛ}_k \cdot \text{МВХЛ}_i / \text{МВХЛ}_k, \text{ где}$$

ИПФФАРЗ<sub>i</sub> - интегральный показатель функционирования ферментов антирадикальной защиты обследуемого, в единицах соотношения каталаза/супероксиддисмутаза, ед. соотн. КАТ/СОД,

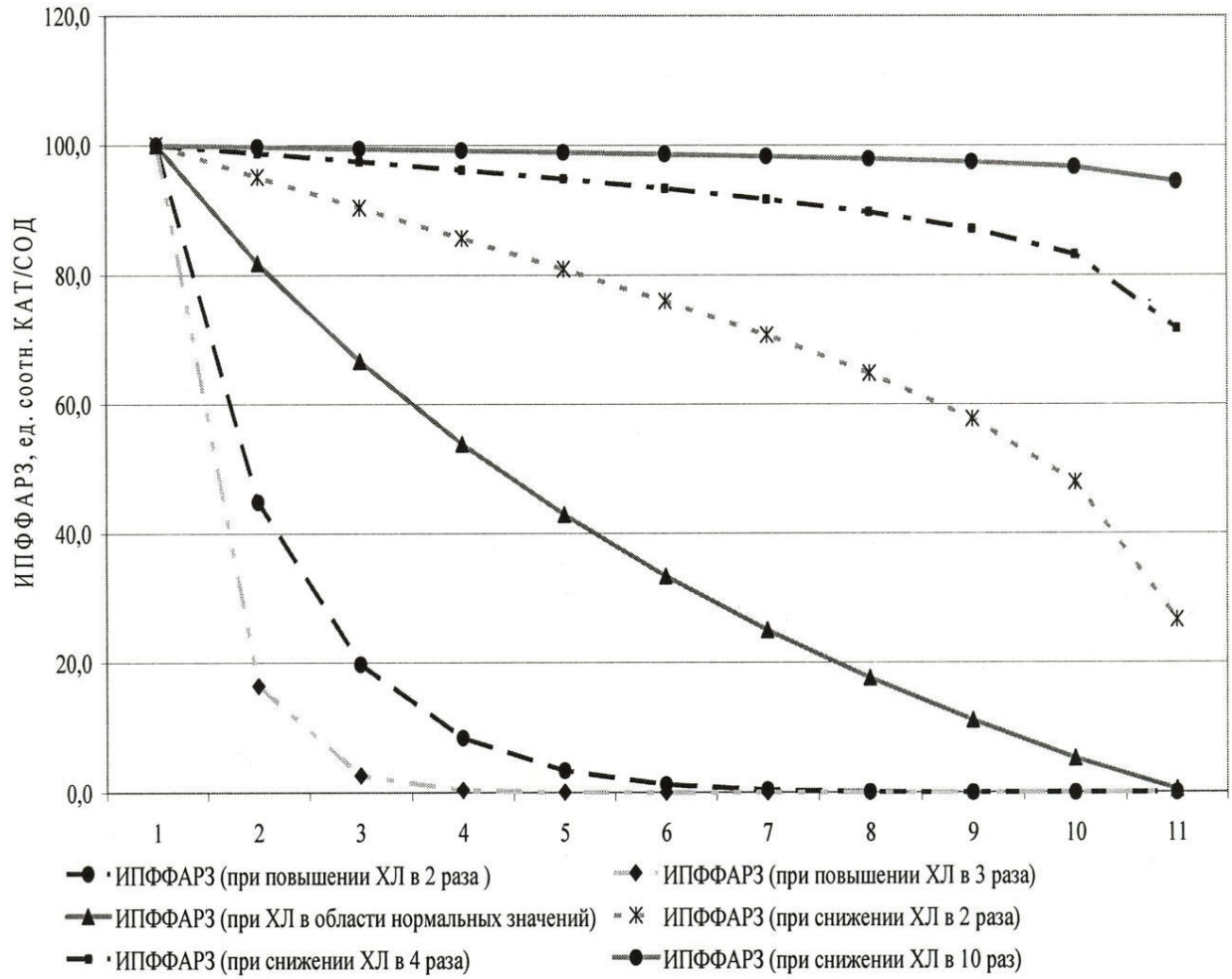
КАТ - активность каталазы гемолизата обследуемого (i) и контрольной группы (k), в единицах активности, ед. акт.,

СОД - активность супероксиддисмутаза гемолизата обследуемого (i) и контрольной группы (k), в единицах активности, ед. акт.,

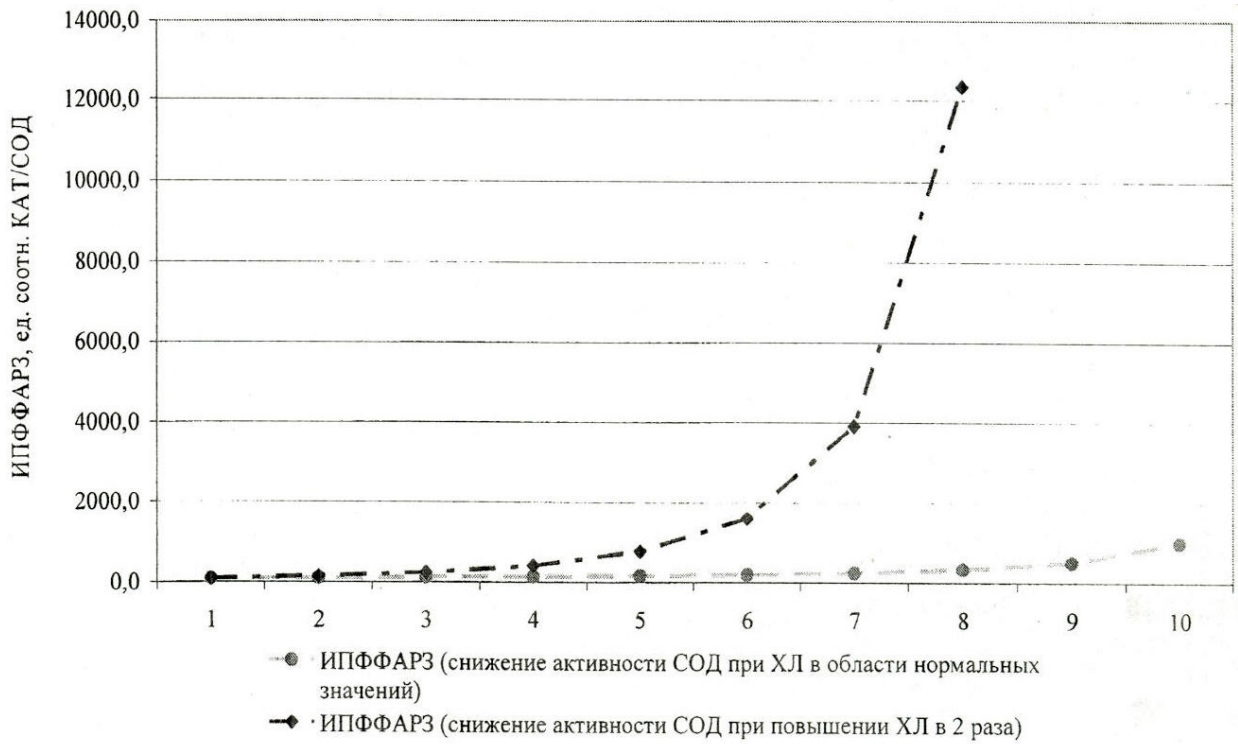
ПХЛ - площадь хемилюминесценции обследуемого (i) и контрольной группы (k), в единицах площади, ед. пл.,

МВХЛ - максимум вспышки хемилюминесценции обследуемого (i) и контрольной группы (k), в условных единицах, усл. ед.,

при значении ИПФФАРЗ<sub>i</sub> ниже 70,0 единиц определяют недостаточность каталазы, а при значении ИПФФАРЗ<sub>i</sub> выше 130,0 единиц определяют недостаточность супероксиддисмутаза.



Фиг. 1



Фиг. 2

