



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **116919** (13) **C2**  
(51) МПК (2018.01)  
**A61B 10/00**  
**G01N 33/483** (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО  
ЕКОНОМІЧНОГО  
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

<p>(21) Номер заявки: <b>a 2016 05284</b></p> <p>(22) Дата подання заявки: <b>16.05.2016</b></p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: <b>25.05.2018</b></p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: <b>25.11.2016, Бюл.№ 22</b></p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>25.05.2018, Бюл.№ 10</b></p>	<p>(72) Винахідник(и): <b>Жерновая Марина Євгеніївна (UA), Вишницька Ірина Анатоліївна (UA), Жуков Віктор Іванович (UA), Комаревцева Ірина Олександрівна (UA), Наконечна Оксана Анатоліївна (UA), Андросов Євген Дмитрович (UA)</b></p> <p>(73) Власник(и): <b>ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, пр. Науки, 4, м. Харків, 61022 (UA)</b></p> <p>(74) Представник: <b>Голданська Анна Вадимівна</b></p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: UA 28193 U, 26.11.2007 Сіренко О.В. Визначення стану цитоплазматичних клітинних мембран за допомогою методів біохемілюмінесценції та фосфоресценції // Вісник харківського національного університету. – 2007. - № 774. С. 46-49 Єфіменко Н.В. та ін. Структурно-функціональний стан еритроцитарних мембран периферичної крові щурів за алкогольної інтоксикації на фоні введення L-аргініну та L-NAME // Науково-технічний бюлетень Інституту біології тварин і Державного науково-дослідного контрольного інституту ветпрепаратів та кормових добавок. – 2014. - Вип. 15. - № 4. – С. 21-27 Лучинський М.А., Лучинський В.М. Структурно-функціональний стан кісткової тканини у дітей, які проживають на екологічно несприятливих територіях // Буковинський медичний вісник. – 2013. – Том 17. - № 1 (65). – С. 55- 59</p>
---	--

UA 116919 C2

**(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ЦИТОПЛАЗМАТИЧНИХ МЕМБРАН**

**(57) Реферат:**

Винахід належить до медицини і може бути використаний в клінічній біохімії й фізіології, терапії й профілактичній медицині, токсикології, судовій медицині й лабораторних дослідженнях. Спосіб діагностики структурно-функціонального стану цитоплазматичних мембран включає визначення інтенсивності спонтанної хемілюмінесценції, індукованої FeCl<sub>3</sub> хемілюмінесценції, люмінол-залежної й індукованої FeCl<sub>3</sub> хемілюмінесценції сироватки крові щурів на 30 й 60 добу

дії на них 1/10, 1/100 й 1/1000  $DL_{50}$  поліоксипропіленгліколю з молекулярною масою 2100 й товарною назвою "Лапрол" (Л-2102), інтенсивності фосфоресценції сироватки, текучість цитоплазматичних мембран еритроцитів і лімфоцитів, окислювальну модифікацію білків мембран даних клітин на 60 добу впливу 1/10 й 1/100  $DL_{50}$  цього ксенобіотика й додатково - відсотковий вміст фосфатидилетаноламіну, сфінгомієліну, фосфатидилінозиту, фосфатидилсерину, фосфатидилхоліну, лізофосфатидилетаноламіну, лізофосфатидилхоліну й кардіоліпину в мембранах еритроцитів, лімфоцитів і гепатоцитів на 60 добу токсифікації тварин 1/100  $DL_{50}$  Л-2102, а також іонну проникність мембран еритроцитів (швидкість самовільного й індукованого валіноміцином виходу іонів  $K^+$  з даних клітин, сумарну кількість цих іонів на 1 млн останніх) на 60 добу дії на щурів 1/10 й 1/100  $DL_{50}$  ксенобіотика.

Винахід належить до медицини, а саме до експериментальної медицини, і може бути використаний в клінічній біохімії й фізіології, терапії, профілактичній медицині, токсикології, судовій медицині й лабораторних дослідженнях.

Актуальність предмету винаходу пов'язана з тим, що сучасні уявлення про патологічні й донозологічні стани все більше спираються на провідну роль структурно-функціональних одиниць організму, як цілісної системи, у підтриманні динамічної гомеостатичної рівноваги й здатності адаптуватися до змін внутрішнього й навколишнього середовища. Такими одиницями є цитоплазматичні мембрани, які відповідають не тільки за регуляцію транспорту речовин, а також і за здійснення міжклітинних контактів шляхом активації рецепторів і специфічних ділянок ідентифікації. У цьому зв'язку, визначення порушень структури й функції клітинних мембран є важливим діагностичним і прогностичним компонентом, що набуває все більшої значимості в умовах постійно зростаючого антропогенного навантаження, особливо при тривалому впливі субтоксичних доз ксенобіотиків.

Відомий спосіб оцінки структури цитоплазматичної клітинної мембрани, що здійснюють шляхом електронної мікроскопії, яка дозволяє визначити кількість слів мембрани й наявність їх помітних ушкоджень [Казначеев В.П., Михайлов Л.П. Сверхслабые излучения в межклеточных взаимодействиях // Новосибирск: Наука, 1981. - 144 с.].

Однак, недоліком цього способу є порушення структури мембрани в процесі фіксації, фарбування й підготовки зразку до дослідження, а також неможливість оцінки окремо стану ліпідного й білкового компонентів, їх конформаційних змін та окислювальної модифікації білків у динаміці. Не можуть бути досліджені методом електронної мікроскопії й окремі молекули цитоплазматичної мембрани, тому що препарати потребують фарбування важкими металами й використання підкладки.

Існує також спосіб оцінки структури біоматеріалу за допомогою електронно-парамагнітного резонансу, який засновано на реєстрації резонансного поглинання електромагнітної енергії в сантиметровому діапазоні довжини хвиль речовинами, що вміщують парамагнітні частинки. І даний біофізичний метод дозволяє досліджувати сироватку й сечу, робити комплексні висновки відносно ушкоджень як ліпідних, так і білкових мембранних структур та оцінювати їх конформаційні зміни, що віддзеркалюють функціональну активність клітини [Дубинина Е.Е., Бурмистрова Р.О., Хадиев Д.А., Поротов И.Г. Окислительная модификация белка. Методы ее определения // Вопросы мед. химии. - 1996. - Т. 41, Вып. 1. - С. 24-26].

Але, цей спосіб не дає змоги визначити ушкодження цитоплазматичної мембрани в разі відсутності в зразку біоматеріалу неспарених електронів. До того ж, він не дозволяє комплексно оцінити функції біомембран організму, що зазнає впливу ксенобіотиків. Нарешті, спосіб електронно-парамагнітного резонансу, як і спосіб електронної мікроскопії, є достатньо складним і передбачає наявність дефіцитної й дорогої апаратури.

Відомий також спосіб діагностики структурно-функціонального стану цитоплазматичних мембран, який включає проведення біохемілюмінесцентних і фосфоресцентних досліджень біологічного матеріалу, що дозволяє на основі змін співвідношення інтенсивності спалаху світіння й кінетики реакції оцінити наявність і ступінь пошкодження ліпідно-білкового шару мембран крові й гомогенатів тканин щурів популяції Вістар, які протягом 45 діб отримували внутрішньошлунково 1/100 середньолетальної дози ( $DL_{50}$ ) ксенобіотика - Лапролу 303 (Л-303) [Патент України № 28193. МПК G01 N33/483. Спосіб діагностики структурно-функціонального стану цитоплазматичних мембран. Опубл. 26.11.2007, Бюл. № 19].

Даний спосіб діагностики структурно-функціонального стану цитоплазматичних мембран є найбільш близьким до того, що заявляється, за технічною суттю й результатом, який може бути досягнутий, тому його вибрано за прототип.

До недоліків прототипу належить те, що за допомогою цього способу є можливість виявлення наявності пошкодження цитоплазматичних мембран під впливом лише 1/100  $DL_{50}$  ксенобіотика, хоча й найбільш часто застосовуваної. Причому, що стосується можливості визначення ступеню пошкодження, то фактично її в прототипі не існує. Крім того, даний спосіб передбачає констатацію порушення структури й функції тільки на певний час дії Л-303 (на 45 добу), що не дозволяє судити про динаміку патологічних процесів у мембранах. Нарешті, у відомому способі недостатня увага приділяється визначенню особливостей змін ліпідного компоненту мембран, а що стосується властивостей останніх, то вони обмежені тільки порушеннями їх текучості.

В основу винаходу поставлено задачу удосконалення способу діагностики структурно-функціонального стану цитоплазматичних мембран за рахунок розширення арсеналу показників, які уточнюють як структуру цитоплазматичних мембран, так і їх функції, а також використання інших субтоксичних доз ксенобіотика й термінів дослідження.

Задачу, яку поставлено в основу винаходу, вирішують тим, що у відомому способі діагностики структурно-функціонального стану цитоплазматичних мембран під впливом 1/100DL<sub>50</sub> Л-303, що включає дослідження інтенсивності біохемілюмінесценції (БХЛ) сироватки крові, гомогенатів печінки й нирок, фосфоресценції (ФР) сироватки крові, текучості плазматичних мембран еритроцитів і лімфоцитів, а також окислювальної модифікації білків мембран цих клітин на 45 добу токсифікації щурів, згідно з заявленим способом, визначають інтенсивність БХЛ (на 30 й 60 добу) і ФР сироватки крові, текучість плазматичних мембран еритроцитів і лімфоцитів, окислювальну модифікацію білків мембран останніх (на 60 добу) і додатково - відсотковий вміст фракцій фосфоліпідів (ФЛ) у мембранах еритроцитів, лімфоцитів і гепатоцитів, а також іонну проникність мембран еритроцитів на 60 добу дії на щурів субтоксичних доз такого ксенобіотика, як поліоксипропіленгліколь з молекулярною масою 2100 й товарною назвою "Лапрол" (Л-2102).

Технічний ефект способу діагностики структурно-функціонального стану цитоплазматичних мембран обумовлений високою діагностичною ефективністю комплексу показників, який заявляється.

Спосіб виконують наступним чином. Визначають інтенсивність спонтанної хемілюмінесценції (СХЛ), індукованої FeCl<sub>3</sub> хемілюмінесценції (FeCl<sub>3</sub>-ІХЛ), люмінол-залежної й індукованої FeCl<sub>3</sub> хемілюмінесценції (ЛЗ FeCl<sub>3</sub>-ІХЛ) сироватки крові щурів лінії Вістар на 30 й 60 добу їх токсифікації 1/10, 1/100 й 1/1000 DL<sub>50</sub> Л-2102 (попередньо проведені дослідження показали, що 1/10000 DL<sub>50</sub> даного ксенобіотика практично не змінювала показники БХЛ сироватки), інтенсивність ФР сироватки крові під впливом тих же доз Л-2102, текучість плазматичних мембран еритроцитів і лімфоцитів, окислювальну модифікацію білків мембран цих клітин на 60 добу дії 1/10 й 1/100 DL<sub>50</sub> ксенобіотика (1/1000 DL<sub>50</sub> Л-2102 не змінювала показники текучості й окислювальної модифікації) і додатково - вміст таких ФЛ, як фосфатидилетаноламіну (ФЕА), фосфатидилхоліну (ФХ), сфінгомієліну (СМ), фосфатидилсерину (ФС), лізофосфатидилетаноламіну (ЛФЕА), лізофосфатидилхоліну (ЛФХ), фосфатидилінозитулу (ФІ) і кардіоліпину (КЛ) у мембранах еритроцитів, лімфоцитів і гепатоцитів на 60 добу впливу 1/100 DL<sub>50</sub> ксенобіотика, а також самовільний та індукований валіноміцином вихід іонів K<sup>+</sup> з еритроцитів і сумарну кількість даних іонів на 1 млн останніх на той же термін токсифікації тварин 1/10 й 1/100 DL<sub>50</sub> Л-2102 (1/1000 DL<sub>50</sub> ксенобіотика не змінювала показники виходу іонів та їх сумарну кількість).

Що стосується можливих сумнівів відносно природи взятого в заявленому способі ксенобіотика (Л-2102), то нами в цьому зв'язку проведені відповідні дослідження, які підтвердили в цілому аналогічність ушкоджуючої дії, зокрема його 1/100 DL<sub>50</sub>, на цитоплазматичні мембрани тих же клітин у порівнянні з тією ж дозою Л-303, вплив якого вивчався в прототипі.

Так, у сироватці крові обстежених нами щурів спостерігалось зростання інтенсивності СХЛ, FeCl<sub>3</sub>-ІХЛ, а також ЛЗ FeCl<sub>3</sub>-ІХЛ і при дії Л-2102, причому не тільки 1/100, а й 1/10 та 1/1000 його DL<sub>50</sub> на 30 добу токсифікації тварин. Найбільш високі рівні досліджуваних показників спостерігались у щурів, на яких впливали 1/10 DL<sub>50</sub> (у середньому в 2,6; 2,8 та 1,4 разу), середні - 1/100 DL<sub>50</sub> (в 1,9; 2,6 та 1,4 разу) і найменші - 1/1000 DL<sub>50</sub> ксенобіотика (в 1,6; 2,1 й 1,02 разу відповідно). Залишилися підвищеними показники в порівнянні з групою контролю й на 60 добу експерименту, знов же, у результаті впливу не тільки 1/100, а й 1/1000 DL<sub>50</sub> Л-2102 (в 1,9; 2,7 та 1,3 разу, а також в 1,7; 2,2 та 1,05 разу відповідно). Однак, при токсифікації тварин 1/10 DL<sub>50</sub> ксенобіотика було виявлено зниження інтенсивності СХЛ, FeCl<sub>3</sub>-ІХЛ і ЛЗ FeCl<sub>3</sub>-ІХЛ - в 1,3; 1,1 й 1,9 разу відповідно.

Тобто, ці дані свідчать, що 1/10, 1/100 й 1/1000 DL<sub>50</sub> Л-2102 теж є активаторами вільнорадикальних процесів і перекисного окислення ліпідів клітинних мембран, які супроводжуються генерацією активних форм кисню, гідроперекисів, перекисів, вільних радикалів. Зменшення інтенсивності БХЛ на 60 добу дії 1/10 DL<sub>50</sub> цього ксенобіотика може свідчити про деструктивні процеси в різних органах і тканинах, що супроводжуються надходженням до сироватки крові вільних сульфгідрильних груп і цистеїну, які є пригнічувачами над слабого світіння. Тому, 1/10 DL<sub>50</sub> Л-2102 слід розглядати як таку, що в разі тривалого впливу призводить до зриву захисно-приспосувальних механізмів, які поєднані з розвитком патологічних процесів і пригніченням системи антиоксидантного захисту, тоді як дія 1/100 й 1/1000 DL<sub>50</sub> ксенобіотика й на даний термін дослідження проявляється значною напругою останніх (табл. 1).

Таблиця 1

Вплив Л-2102 на динаміку інтенсивності БХЛ сироватки крові в умовах тривалої субтоксичної дії (1°-імпл/с)

Показники, терміни	Група спостереження, М±m (DL <sub>50</sub> )			
	Контроль (n=10)	1/10 (n=10)	1/100 (n=10)	1/1000 (n=10)
30 доба:				
СХЛ,	134,3±9,5	348,4±16,2*	260,3±18,4*	215,4±13,5*
FeCl <sub>3</sub> -ІХЛ,	672,4±15,6	1873,5±24,8*	1742,6±22,7*	1427,5±16,3*
ЛЗ FeCl <sub>3</sub> -ІХЛ	1795,6±31,4	2463,7±33,5*	2241,5±28,9*	1832,6±21,4*
60 доба:				
СХЛ,	152,7±11,8	114,6±7,9*	295,6±14,8*	257,4±17,5*
FeCl <sub>3</sub> -ІХЛ,	683,6±16,7	617,8±11,6*	1863,7±25,8*	1485,6±20,7*
ЛЗ FeCl <sub>3</sub> - ІХЛ	1788,4±40,5	965,3±17,4*	2362,8±37,9*	1882,6±18,5*

Примітка: у таблицях 1-6 \* - різниця вірогідна (p < 0,05).

- 5 Підвищувалася під впливом досліджуваного ксенобіотика й інтенсивність ФР сироватки крові щурів на 60 добу їх токсифікації, причому не тільки 1/100 його DL<sub>50</sub>, а й 1/10 та 1/1000 DL<sub>50</sub> (табл. 2), що може свідчити про наявність високих рівнів триплетних збуджених станів, обумовлених непоєднаними електронами, які супроводжуються зміною конформаційної структури білкових молекул і можуть бути поєднані з їх окислювальною модифікацією.

Таблиця 2

Дія Л-2102 на інтенсивність ФР сироватки крові на 60 добу спостереження

Спектри збудження (нм)	Група спостереження, М±m (DL <sub>50</sub> )			
	Контроль (n=10)	1/10 (n=10)	1/100 (n=10)	1/1000 (n=10)
297	4270,6±35,2	6535,8±41,5*	5392,6±38,7*	4940,3±35,8*
313	3215,4±27,3	5997,3±32,4*	4898,3±25,6*	3810,7±29,3*
334	627,8±18,5	1240,6±20,7*	1124,7±22,8*	925,4±18,9*
365	1868,4±29,4	2684,5±22,3*	2497,3±27,2*	2205,3±27,4*
404	412,3±11,7	1368,6±14,5*	1292,6±20,7*	971,5±18,6*
434	614,8±16,5	1287,2±21,3*	1159,7±18,4*	980,6±16,3*

- 10 При цьому, як і в разі з Л-303 (у прототипі), особливо значне підвищення інтенсивності ФР відносно контрольної групи спостерігалось при довжинах хвиль збудження 404 нм (у 3,3; 3,1 й 2,4 разу) і 434 нм (у 2,1; 1,9 та 1,6 разу) у результаті впливу 1/10, 1/100 й 1/1000 DL<sub>50</sub> Л-2102 відповідно.

- 15 Крім того, по закінченні експерименту було встановлено й зниження текучості цитоплазматичних мембран лімфоцитів (у 2,3 та 1,8 разу в білок-ліпідних контактах і в 2,1 й 1,6 разу в ліпідному бішарі) та еритроцитів (у 2,1 й 1,6 разу в білок-ліпідних контактах і в 1,9 та 1,7 разу в ліпідному бішарі) у разі дії 1/10 й 1/100 DL<sub>50</sub> досліджуваного ксенобіотика відповідно (табл. 3).

Таблиця 3

Вплив Л-2102 на текучість мембран клітин крові (коефіцієнт ексімеризації пірену (λ випромінювання - 470 нм/λ випромінювання - 393 нм) в умовах тривалої токсифікації

Група тварин, доза	Показники, М±m			
	Лімфоцити		Еритроцити	
	Білок-ліпідні контакти	Ліпідний бішар	Білок-ліпідні контакти	Ліпідний бішар
Контроль (n=10)	3,78±0,26	3,60±0,23	2,86±0,14	2,82±0,17
1/10 (n=10)	1,65±0,18*	1,73±0,26*	1,35±0,09*	1,48±0,06*
1/100 (n=10)	2,13±0,14*	2,20±0,19*	1,83±0,07*	1,67±0,13*

Нарешті, мала місце й активація окислювальної модифікації білків цитоплазматичних мембран лімфоцитів та еритроцитів при дії досліджуваного ксенобіотика, зокрема 1/10 й 1/100 його DL<sub>50</sub>, що підтверджувалося зростанням у сироватці крові рівнів 2,4-днітрофенілальдогідразонів (2,4-ДНФАГ) (у 2,9 та 1,9 рази) і 2,4-днітрофенілкетогідразонів (2,4-ДНФКГ) (у 2,7 та 1,8 рази відповідно) (табл. 4).

Таблица 4

Дія Л-2102 на окислювальну модифікацію білків на 60 добу токсифікації

Показники	Група спостереження, DL <sub>50</sub> (M±m)		
	Контроль (n=10)	1/10 (n=10)	1/100(n=10)
2,4-ДНФАГ, д. опт. щільн./г білка, λ=370 нм	23,52±1,74	68,35±3,96*	44,18±2,66*
2,4-ДНФКГ, од. опт. щільн./г білка, λ=380 нм	27,35±1,86	74,82±3,85*	49,23±3,17*

Отже, вищезазначені дані свідчать про суттєві ушкодження як ліпідних, так і білкових структур плазматичних мембран під впливом такого ксенобіотика, як Л-2102, причому, не тільки 1/100 його DL<sub>50</sub>, а й ще більше - 1/10 DL<sub>50</sub>, а стосовно деяких показників - навіть 1/1000 DL<sub>50</sub>.

Оскільки ж відомо, що досліджуваний ксенобіотик відноситься до неіоногенних поверхнево-активних речовин, імовірність його впливу на ліпідні компоненти мембран є дуже високою. У цьому зв'язку було додатково проведено визначення вмісту фракцій ФЛ у мембранах еритроцитів, лейкоцитів і гепатоцитів на 60 добу дії Л-2102, зокрема 1/100 його DL<sub>50</sub>, як загальноприйнятої. Дослідження виявили суттєві порушення рівня ФЛ у мембранах клітин крові й печінки. Так, вплив ксенобіотика супроводжувався зниженням вмісту ФЕА (в 1,39-1,58; 1,48-1,75 та 1,32-1,58 рази), СМ (в 1,27-1,50; 1,43-1,65 та 1,50-1,74 рази), ФС (в 1,51-1,75; 1,18-1,40 та 1,27-1,51 рази) і ФІ (в 1,64-1,91; 1,81-2,20 та 1,77-2,22 рази), а також підвищенням рівня ФХ (в 1,34-1,46; 1,46-1,64 та 1,50-1,64 рази), ЛФЕА (у 2,88-3,65; 2,30-3,90 і 2,73-3,35 рази), ЛФХ (у 2,45-3,15; 3,10-3,70 і 2,92-3,80 рази) і КЛ (в 1,68-1,84; 1,29-1,44 та 1,59-1,77 рази) в еритроцитах, лейкоцитах і гепатоцитах відповідно (табл. 5).

Таблица 5

Вплив Л-2102 в 1/100 його DL<sub>50</sub> на фосфоліпідний склад мембран еритроцитів, лейкоцитів і гепатоцитів щурів при тривалій токсифікації (%)

Показники	Контрольна група (M±m), n=10			Дослідна група (M±m), n=10		
	еритроцити	Лейкоцити	Гепатоцити	Еритроцити	Лейкоцити	Гепатоцити
ФЕА	21,3±1,53	24,5±1,83	23,62±1,75	14,4±0,96*	15,3±1,27*	16,4±1,45*
ФХ	41,3±1,72	38,6±1,61	38,7±1,42	57,8±2,53*	59,8±3,34*	60,7±2,73*
СМ	14,4±1,26	17,3±1,52	15,8±1,16	10,5±0,88*	11,3±0,82*	9,8±0,74*
ФС	11,5±0,84	9,3±0,73	9,82±0,87	7,1±0,54*	7,25±0,63*	7,12±0,63*
ЛФЕА	1,2±0,42	1,41±0,21	1,43±0,65	3,92±0,46*	3,67±0,42*	4,35±0,44*
ЛФХ	1,5±0,33	1,22±0,04	1,27±0,08	4,2±0,52*	4,15±0,37*	4,27±0,56*
ФІ	6,2±0,73	7,2±0,68	7,54±0,86	3,51±0,27*	3,62±0,35*	3,82±0,43*
КЛ	0,5±0,08	0,63±0,06	0,56±0,04	0,88±0,04*	0,86±0,05*	0,94±0,05*

До того ж, дослідження показали, що тривала субтоксична дія Л-2102 супроводжується глибокими порушеннями й фізико-хімічних властивостей мембран, зокрема їх іонної проникності. Так, на 60 добу експерименту 1/10 й 1/100 DL<sub>50</sub> ксенобіотика підвищували самовільний та індукований валіноміцином вихід іонів K<sup>+</sup> з еритроцитів, а також сумарну кількість цих іонів на 1 млн останніх у порівнянні з групою контролю (табл. 6). Було встановлено, що більш інтенсивно Л-2102 впливає на самовільний вихід іонів K<sup>+</sup> з еритроцитів (у 10,96-12,63 і 9,74-11,52 рази), а ніж індукований валіноміцином (у 2,34-2,78 та 1,90-2,28 рази) і сумарну кількість даних іонів на 1 млн клітин (у 4,69-5,31 й 4,07-4,73 рази відповідно).

Дія Л-2102 на самовільний та індукований валіноміцином вихід іонів  $K^+$  з еритроцитів (млн/хв)

Група тварин, доза	Швидкість самовільного виходу $K^+$ з еритроцитів	Швидкість індукованого валіноміцином виходу $K^+$	Сумарна кількість іонів $K^+$ на 1 млн еритроцитів
Контроль	0,54±0,02	6,75±0,34	18,73±1,68
1/10 (n=10)	6,37±0,45*	17,28±1,47*	93,65±5,82*
1/100 (n=10)	5,74±0,48*	14,10±1,26*	82,46±6,17*

Виходить, що показник іонної проникності мембран є дуже чутливим при дослідженні їх функцій.

5 Якщо порівняти зсуви досліджуваних показників, які використовувались і в прототипі, з такими, що додатково запропоновані в заявленому способі, то виходить, що для БХЛ вони становили в середньому максимум 2,8 рази, для ФР - 3,3 рази, для текучості - 2,3 рази й для окислювальної модифікації білків - 2,9 рази, у той час як для вмісту ФЛ - 3,4 рази, а для іонної проникності - 11,8 разу! Тобто, додаткові показники заявленого способу можуть розглядатися в якості досить інформативних маркерів, які віддзеркалюють стан структури й функції

10 цитоплазматичних мембран, що дозволяє рекомендувати їх застосовування в діагностиці донозологічних і патологічних станів.

Отже, отримані дані свідчать, що додаткове використання показників у заявленому способі дозволяє більш об'єктивно судити як про розвиток молекулярної мембранної патології (на підставі констатації й зсувів вмісту ФЛ), так і порушення фізико-хімічних властивостей

15 цитоплазматичних мембран (на підставі констатації й змін іонної проникності), що дозволяє вважати перспективним заявлений спосіб діагностики структурно-функціонального стану цитоплазматичних мембран для широкого використання не тільки в експериментальній, а й в практичній медицині.

Таким чином, заявлений спосіб діагностики структурно-функціонального стану

20 цитоплазматичних мембран має суттєві переваги стосовно прототипу. Він сприяє більш високій інформативності щодо виявлення порушення як структури, так і функцій мембран, не потребує дефіцитних або дорогих реактивів та обладнання, а тому є корисним для медицини й може бути рекомендований для широкого впровадження в практику роботи як експериментаторів і науковців, так і лікарів-лаборантів з метою більш об'єктивної констатації наявності патологічних

25 і донозологічних станів у людини, зокрема в умовах тривалої субтоксичної дії на неї ксенобіотиків, а тому й своєчасного надання їй відповідної медичної допомоги.

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

30 Спосіб діагностики структурно-функціонального стану цитоплазматичних мембран сироватки крові й гомогенатів тканин щурів популяції Вістар на 45 добу токсифікації їх 1/100 середньолетальної дози ( $DL_{50}$ ) ксенобіотика Лапролу 303, що включає проведення біохемілюмінесцентних і фосфоресцентних досліджень біологічного матеріалу та оцінку наявності пошкодження ліпідно-білкового шару мембран на основі змін співвідношення

35 інтенсивності спалаху світіння й кінетики реакції, який **відрізняється** тим, що визначають інтенсивність спонтанної хемілюмінесценції (СХЛ), індукованої  $FeCl_3$  хемілюмінесценції ( $FeCl_3$ -ІХЛ), люмінол-залежної й індукованої  $FeCl_3$  хемілюмінесценції (ЛЗ  $FeCl_3$ -ІХЛ) сироватки крові щурів на 30 й 60 добу дії на них 1/10, 1/100 й 1/1000  $DL_{50}$  поліоксипропіленгліколю з молекулярною масою 2100 й товарною назвою "Лапрол" (Л-2102), інтенсивність

40 фосфоресценції (ФР) сироватки, текучість цитоплазматичних мембран еритроцитів і лімфоцитів, окислювальну модифікацію білків мембран даних клітин на 60 добу впливу 1/10 й 1/100  $DL_{50}$  цього ксенобіотика й додатково відсотковий вміст фосфатидилетаноламіну (ФЕА), сфінгомієліну (СМ), фосфатидилінозитолу (ФІ), фосфатидилсерину (ФС), фосфатидилхоліну (ФХ), лізофосфатидилетаноламіну (ЛФЕА), лізофосфатидилхоліну (ЛФХ) і кардіоліпіну (КЛ) у мембранах еритроцитів, лімфоцитів і гепатоцитів на 60 добу токсифікації тварин 1/100  $DL_{50}$  Л-

45 2102, а також іонну проникність мембран еритроцитів (швидкість самовільного й індукованого валіноміцином виходу іонів  $K^+$  з даних клітин, сумарну кількість цих іонів на 1 млн останніх) на 60 добу дії на щурів 1/10 й 1/100  $DL_{50}$  ксенобіотика, що об'єктивізує наявність порушення складу й властивостей цитоплазматичних мембран, зокрема у разі зниження вмісту ФЕА в 1,58-1,39; 1,75-1,48 та 1,58-1,32 разу, СМ в 1,50-1,27; 1,65-1,43 та 1,74-1,50 разу, ФС в 1,75-1,51; 1,40-1,18 та 1,51-1,27 разу й ФІ в 1,91-1,64; 2,20-1,81 й 2,22-1,77 разу, збільшення рівня ФХ в 1,34-1,46;

50

1,46-1,64 та 1,50-1,64 разу, ЛФЕА у 2,88-3,65; 2,30-2,90 і 2,73-3,35 разу, ЛФХ у 2,45-3,15; 3,10-3,70 і 2,92-3,80 разу й КП в 1,68-1,84; 1,29-1,44 й 1,59-1,77 разу в еритроцитах, лейкоцитах і гепатоцитах відповідно, а також швидкості самовільного (у 10,96-12,63 і 9,74-11,52 рази) та індукованого валіноміцином виходу іонів  $K^+$  з еритроцитів (у 2,34-2,78 та 1,90-2,28 рази) і сумарної кількості даних іонів на 1 млн останніх (у 4,69-5,31 й 4,07-4,73 рази) під впливом 1/10 й 1/100  $DL_{50}$  Л-2102, відповідно.

---

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

---

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

---

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601