



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Статус: не действует (последнее изменение статуса: 02.07.2021)
Пошлина: Возможность восстановления: нет.

(21)(22) Заявка: [2013115145/15](#), 04.04.2013(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
04.04.2013

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 04.04.2013

(45) Опубликовано: [20.05.2014](#) Бюл. № 14

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: S. Kojima et al. Low dose gamma-rays activate immune functions via induction of glutathione and delay tumor growth // J. Radiat. Res. - 2004. - Vol.45, N1. - P.33-39. RU 2241992 C1, 10.12.2004. RU 2163021 C2, 10.02.2001. M.M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Analyt. Biochem. - 1976. - Vol.7, N1, 2. - P.248-254

Адрес для переписки:

634012, г.Томск, ул. Киевская, 111а, ФГБУ
"НИИ кардиологии" СО РАМН, Патентовед
Н.Л. Малюгина

(72) Автор(ы):

Канская Наталья Викторовна (RU),
Степовая Елена Алексеевна (RU),
Федорова Нина Александровна (RU),
Носарева Ольга Леонидовна (RU),
Позднякова Ирина Анатольевна (RU),
Канский Александр Викторович (RU),
Твердохлебов Сергей Иванович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное учреждение "Научно-исследовательский институт кардиологии" Сибирского отделения Российской академии медицинских наук (RU),
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Национальный исследовательский Томский политехнический университет" (RU),
Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Сибирский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU)

(54) СПОСОБ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ СТИМУЛЯЦИИ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине и описывает способ оценки эффективности стимуляции антиоксидантной активности путем определения концентрации восстановленного глутатиона, при этом дополнительно в инкубационную среду добавляют 1,4-дителиоэритритол и аскорбиновую кислоту и при увеличении уровня восстановленного глутатиона с 0,75 нмоль/мг белка до 0,90 нмоль/мг белка и более стимуляцию антиоксидантной системы оценивают как эффективную, а при росте уровня восстановленного глутатиона с 0,75 нмоль/мг белка до 0,80 нмоль/мг белка и менее стимуляцию антиоксидантной активности оценивают как неэффективную. Способ обеспечивает повышение точности, прост в осуществлении и интерпретации полученных результатов. 1 табл.

Известны способы оценки эффективности антиоксидантной активности путем определения роста общего содержания SH-групп белков [Microtubule dynamics and glutathione metabolism in phagocytizing human polymorphonuclear leukocytes / B.R. Burchill, J.M. Oliver, C.V. Pearson et al. // J. of Cell Biology. - 1978. - Vol.76, №2. - P.439-447], но данная методика не позволяет оценить уровень восстановленного глутатиона, а, следовательно, оценить эффективность антиоксидантной активности. Известен также способ косвенного определения содержания восстановленного глутатиона по активности глутатионпероксидазы [Медицинские лабораторные технологии: В 2-х томах. / Под ред. А.И. Карпищенко - Т.2 / А.И. Карпищенко. - СПб.: Интермедика. - 1999. - 656 с.], однако активность этого фермента зависит от конформации активного центра фермента. При изменении конформации активного центра фермента его активность меняется, что не позволяет с высокой точностью оценить уровень восстановленного глутатиона, а, следовательно, оценить эффективность антиоксидантной активности. Известен также способ косвенного определения концентрации восстановленного глутатиона по активности глутатионредуктазы [Медицинские лабораторные технологии: В 2-х томах. / Под ред. А.И. Карпищенко - Т.2 / А.И. Карпищенко. - СПб.: Интермедика. - 1999. - 656 с.], однако активность этого фермента зависит от конформации активного центра фермента. При изменении конформации активного центра фермента его активность меняется, что не позволяет достоверно в любой ситуации оценить с высокой точностью уровень

восстановленного глутатиона, а следовательно, оценить эффективность антиоксидантной активности.

Известен также способ оценки эффективности антиоксидантной активности по содержанию восстановленного глутатиона, предложенный М.Е. Anderson (1985) в модификации S. Kojima et al. (2004) [Low dose gamma-rays activate immune functions via induction of glutathione and delay tumor growth / S. Kojima, K. Nakayama, H. Ishida // J. Radiat. Res. - 2004. - Vol.45, №1. - P.33-39], основанный на взаимодействии восстановленного глутатиона (GSH) с 5,5'-дитио-бис(2-нитробензойной) кислотой (ДТНБ). При этом образуется окисленный глутатион (GSSG), который затем восстанавливается и вновь взаимодействует с ДТНБ. Данный способ является наиболее близким к предлагаемому по технической сущности и достигаемому результату и выбран в качестве прототипа.

Недостатком данного способа является невозможность стимуляции эффективности работы антиоксидантной активности.

Целью предлагаемого изобретения является повышение эффективности и точности способа.

Указанная цель достигается дополнительным добавлением в инкубационную среду 1,4-дителиозитрита и аскорбиновой кислоты для оценки эффективности стимуляции антиоксидантной активности.

Новым в данном способе является внесение в инкубационную среду 1,4-дителиозитрита и аскорбиновой кислоты, без которых невозможна стимуляция антиоксидантной активности и последующая оценка ее эффективности.

Следовательно, только комплексная модернизация способа-прототипа позволяет получить желаемый результат. Только комплексное внесение в инкубационную смесь 1,4-дителиозитрита и аскорбиновой кислоты позволяет повысить точность оценки эффективности стимуляции антиоксидантной активности, а именно при увеличении уровня восстановленного глутатиона с 0,75 нмоль/мг белка до 0,90 нмоль/мг белка и более стимуляцию антиоксидантной активности оценивают как эффективную, а при росте уровня восстановленного глутатиона с 0,75 нмоль/мг белка до 0,80 нмоль/мг белка и менее стимуляцию антиоксидантной активности оцениваем как неэффективную.

Антиоксидантная система направлена на эффективную нейтрализацию прооксидантов и снижение токсичной для организма гидроперекиси. Основным компонентом антиоксидантной системы является восстановленная форма глутатиона.

Глутатион - трипептид (L-γ-глутамил-L-цистеилглицин) с молекулярной массой 307 Da, занимает особое место среди SH-содержащих соединений. Наличие γ-глутамильной связи защищает трипептид от ферментативной деградации. В организме глутатион присутствует в двух формах: окисленной - GSSG и восстановленной - GSH, причем содержание GSH в клетках на несколько порядков выше, чем GSSG [Колесниченко Л.С., 1989; Wu G. et al., 2004; Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н., 2005; Марри Р. и соавт., 2009]. По данным P. Pietarinen-Runtti et al. (2000), концентрация GSH в нейтрофилах составляет около 5 нмоль/мг белка. Содержание глутатиона в сыворотке крови здоровых людей незначительно, поэтому клетки основную потребность в GSH обеспечивают путем нематричного синтеза [Wu G. et al., 2004] в ходе двух последовательных реакций, катализируемых γ-глутамилцистеин-синтетазой (КФ 6.3.2.2) и глутатион-синтетазой (КФ 6.3.2.3) [Кулинский В.И., 1990; Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н., 2005; Марри Р. и соавт., 2009]. Лимитирующим звеном синтеза является образование γ-глутамилцистеина, зависящее от наличия L-цистеина и его способности окисляться в L-цистин [Зенков Н.К. и соавт., 2001]. В то же время недостаточность глутатион-синтетазы способствует развитию окислительных повреждений в нейтрофилах [Spielberg S.P. et al., 1979].

Глутатион при физиологических значениях pH имеет две анионные карбоксигруппы, положительно заряженную аминогруппу и SH-группу цистеинового остатка, которая придает GSH свойства восстановителя и способность быстро обезвреживать свободные радикалы и АФК [Day R.M., 2005; Zhu Y., 2007; Circu C.L. et al., 2009]. Глутатин является типичным тиолом и, участвуя в одноэлектронных восстановительных реакциях, становится GS[•], который димеризуется до GSSG, легко реагирующего со свободными SH-группами. Второй тип окислительно-восстановительных превращений с участием GSH - это реакции тиолдисульфидного обмена, которые известны как основной путь образования смешанных дисульфидов глутатиона с белками (белок-SSG) и играют роль в регуляции биологических процессов [Chai Y.C. et al., 1994]. В реакциях третьего типа происходит двухэлектронное окисление глутатиона с образованием интермедиата, который реагирует со второй молекулой GSH (получение GSSG) или иной молекулой (синтез смешанного дисульфида) [Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н., 2005].

GSH является ингибитором АФК и стабилизатором мембран [Биленко М.В., 1989; Uduri V., 1992; Trudel S. et al., 2009]. Он защищает клеточные структуры нейтрофилов от высокотоксичного OCl⁻, производимого МПО [Carr A.C., Winterbourn C.C., 1997],

при этом GSH превращается в глутатион-сульфонамид и дегидроглутатион [Harwood D.T. et al., 2006]. Связывая NO, глутатион образует токсичные для клетки нитрозильные комплексы. Моно нитрозоглутатион может активировать апоптоз [Turpaev K.T. et al., 1997].

Не всегда восстановительного потенциала GSH достаточно для полной нейтрализации прооксидантов. Существует мнение, что взаимодействие GSH с органическими радикалами эффективно только в условиях удаления H_2O_2 , поэтому глутатион образует с супероксиддисмутазой своеобразную антиоксидантную систему, ибо в противном случае развиваются реакции образования H_2O_2 и GS^\cdot [Панкин В.З. и соавт., 1997; Меньшикова Е.Б. и соавт., 2006]. В сочетании с витамином В12 глутатион, а также N-ацетилцистеин могут потенцировать прооксидантное и цитотоксическое действие на клетку [Соловьева М.Е. и соавт., 2007].

Основной антиоксидантный эффект GSH реализуется посредством участия в работе ферментов. Глутатион выступает донором водорода при восстановлении H_2O_2 и перекисей липидов глутатион-пероксидазами и глутатион-8-трансферазами (ГТ) [Hirayama K., 1989; Sies H. et al., 1997; Кулинский В.И., 1990; Hayes J.D. et al., 2005; Зенков Н.К. и соавт., 2009; Liu G. et al., 2010]. Высокая активность глутатион-редуктазы и накопление GSH оказывает протекторный эффект в отношении альвеолярных макрофагов, инкубируемых с прооксидантами *in vitro* [Pietarinen P.K. 1995].

С изменением окислительно-восстановительного баланса сопряжено большое количество реакций, поэтому поддержание оптимального редокс-состояния цитозоля выступает важным условием нормальной жизнедеятельности клеток. Высокая концентрация глутатиона в цитоплазме, его редокс-активность и возможность поддержания в восстановленном состоянии делают систему GSH/GSSG важнейшим внутриклеточным редокс-буфером [Reed M.C. et al., 2008]. Концентрация GSH в клетке в 500-1000 раз превышает уровень НАДФН и других внутриклеточных редокс-систем, поэтому изменения соотношения GSH/GSSG прямо отражают изменения редокс-статуса клетки [Кулинский В.И., 2007; Asian M, Canatan D., 2008; Reed M.C, 2008]. Считают, что буферная емкость системы глутатиона защищает репликативную систему клетки, а дефицит GSH в условиях высокой генерации АФК приводит к снижению синтеза ДНК и белков [Poot M., 1991; Панкин В.З., 1997; Day R.M., Suzuki Y.J., 2005; Liu G. et al., 2010].

К природным антиоксидантам относят также аскорбиновую кислоту, которая играет важную роль в развитии окислительного стресса в организме.

Аскорбиновая кислота реализует свое антиоксидантное действие в плазме, межклеточной жидкости и на внеклеточном уровне. В организме человека аскорбиновая кислота преимущественно представлена в L-форме. Стрессовые ситуации увеличивают количество метаболитов витамина С в виде дегидроаскорбиновой кислоты.

Аскорбиновая кислота и дегидроаскорбиновая кислота играют активную роль в нескольких процессах, включая защиту от инфекции, повышении иммунности, в процессах заживления ран, а также принимая участие в образовании антистрессовых гормонов. Аскорбат является кофактором дофамин- β -гидроксилазы, которая катализирует синтез норадреналина и других катехоламинов. Аскорбиновая кислота является восстановителем для L-пролингидроксилазы, которая необходима для синтеза коллагена и соединительной ткани в целом. В организме с участием аскорбиновой кислоты происходит регенерация α -токоферола из токофероксильного радикала. Окислительный стресс коррелирует с ухудшением секреции инсулина, а терапия аскорбиновой кислотой прерывает повреждающее действие свободных радикалов, уменьшает степень проявления инсулиновой резистентности [М.И. Балаболкин и соавт., 2003]. Ионы аскорбата являются одним из активных элементов системы антиоксидантной защиты, предохраняя липиды от окисления их пероксидными радикалами. Антиоксидантный эффект аскорбата проявляется при достаточном количестве других антиоксидантов, таких как α -токоферол и глутатион. Глутатион восстанавливает дегидроаскорбиновую кислоту прямым и неферментативным путем до аскорбиновой кислоты. Эта реакция является одним из основных механизмов антиоксидантной системы, часто описываемых как восстановительные циклы - глутатион/глутатиондисульфид и аскорбиновая/дегидроаскорбиновая кислота. При этом клетки периферических тканей поглощают экзогенную дегидроаскорбиновую кислоту и в присутствии глутатиона конвертируют ее в цитоплазме в аскорбиновую кислоту. Восстановление глутатиондисульфида в глутатион катализируется глутатион редуктазой и требует участия NADPH в качестве кофактора. Недостаточность глутатиона снижает содержание аскорбиновой кислоты в тканях и одновременно повышает концентрацию дегидроаскорбиновой кислоты.

При недостатке α -токоферола и глутатиона может превалировать прооксидантный

эффект аскорбата и его метаболитов. Прооксидантный эффект аскорбиновой кислоты может наблюдаться не только при недостатке α -токоферола и глутатиона, но и при применении высоких доз аскорбиновой кислоты. Избежать прооксидантного эффекта аскорбиновой кислоты можно в случае создания адекватного внутриклеточного уровня восстановленного глутатиона.

Исходя из вышесказанного целесообразно использовать в эксперименте комплексное применение аскорбата с протектором SH-групп, а именно 1,4-дителиозитритолом. Для проникновения внутрь клетки пассивным транспортом происходит превращение аскорбиновой кислоты в дегидроаскорбиновую кислоту, затем последняя подвергается обратимому превращению в аскорбиновую кислоту при участии восстановленного глутатиона. Следовательно, комплексная модернизация способа-прототипа позволяет повысить точность оценки эффективности стимуляции антиоксидантной активности.

Каждый вновь введенный в формулу изобретения признак выполняет функцию повышения точности и эффективности способа: дополнительное добавление в инкубационную среду 1,4-дителиозитритола и аскорбиновой кислоты для последующего определения восстановленного глутатиона.

Роль антиоксидантной системы клетки заключается в снижении токсического эффекта свободных радикалов, в том числе и гидроперекисей липидов.

Антиоксидантную защиту обеспечивает широкий круг веществ, различных по происхождению, физико-химической природе и механизмам действия. Одним из свойств, по определению J.M. Gutteridge (1992), является способность, присутствуя в низких по сравнению с окисляемым субстратом концентрациях, существенно задерживать или ингибировать его окисление. Постоянное образование прооксидантов должно быть уравновешено их инактивацией, поэтому для поддержания гомеостаза необходима адекватная ситуации непрерывная регенерация антиоксидантной способности клеток [Зенков Н.К. и соавт., 2001; Blokhina O. et al., 2003].

Общепринятой номенклатуры антиоксидантов в настоящее время не существует, хотя ряд авторов [Dinascio P., 1990; Kalra V. et al., 2001; Зайцев В.Г. и соавт., 2003] выделяет два класса: превентивные, снижающие скорость инициации цепной реакции окисления, и гасящие (прерывающие цепь), препятствующие развитию цепной реакции. К превентивным относят каталазу и пероксидазы, разрушающие ROOH, а также агенты, образующие хелатные комплексы с металлами переменной валентности, к прерывающим цепь - фенолы, ароматические амины. В условиях *in vivo* главными гасящими антиоксидантами являются: витамин E, нейтрализующий ROO \cdot в липидной фазе мембран [Jore D. et al., 1990; Hong J.H. et al., 2004], фермент СОД, улавливающий $\text{O}_2^{\cdot-}$ в водной фазе клетки [Fridovich I., 1989; Dinascio P., 1990; Ciurea D., 1992], и церулоплазмин - белок острой фазы, выполняющий антирадикальную функцию в крови [Marklund S.L., 1987; Atanasiu R.X. et al., 1998].

Более известно деление антиоксидантов на ферменты и соединения неферментативной природы. Последние в определенных концентрациях всегда присутствуют в липидной фазе мембран и водных средах организма и расходуются первыми при устранении проявлений окислительного стресса [Droge W., 2002; Blokhina O., 2003]. Ферменты наиболее активно присоединяется к АОЗ после включения механизмов индукции [Лушак В.И., 2001]. При возникновении ОС расход антиоксидантов возрастает и меняется экспрессия генов, кодирующих белковые компоненты АОЗ [Дубинина Е.Е., 2006]. Между ферментами и неферментативными элементами АОЗ существует равновесие, причем последние при ряде патологических состояний организма могут выступать в качестве прооксидантов [Зенков Н.К. и др., 2001].

Главную роль среди неферментативных антиоксидантных систем защиты отводят глутатиону.

В настоящее время в лабораторной практике наиболее распространен способ оценки эффективности антиоксидантной активности с помощью определения восстановленного глутатиона.

Содержание восстановленного глутатиона определяют методом, предложенным M.E. Anderson (1985) в модификации S. Kojima et al. (2004) [Kojima, S. Low dose gamma-rays activate immune functions via induction of glutathione and delay tumor growth / S. Kojima, K. Nakayama, H. Ishida // J. Radiat. Res. - 2004. - Vol.45, №1. - P.33-39]. Принцип метода основан на взаимодействии GSH с 5,5'-дителио-бис(2-нитробензойной) кислотой (ДТНБ) с образованием тио-2-нитробензойной кислоты, водный раствор которой имеет максимум поглощения при длине волны 412 нм. При этом образуется GSSG, который восстанавливается глутатионредуктазой до GSH и вновь взаимодействует с ДТНБ. Скорость образования окрашенного продукта пропорциональна содержанию общего глутатиона. Для определения содержания GSSG пробы прединкубируются с блокатором SH-групп 2-винилпиридином («Wako», Япония), который необратимо связывает GSH и, следовательно, скорость образования окрашенного продукта

пропорциональна содержанию GSSG.

Лизат лимфоцитов крови готовят на 5% сульфосалициловой кислоте, которая осаждает белки, но не ингибирует активность глутатионредуктазы. Количество общего глутатиона (GSH и GSSG) определяют в пробе содержащей 0,1 М Na-фосфатный буфер (рН=7,5) с 1 мМ ЭДТА, 0,4 мМ НАДФН₂, 0,3 мМ ДТНБ и 1 У/мл глутатион-редуктазы («Wako», Япония). При измерении уровня GSSG супернатант предварительно инкубируют 30 мин с 10 мМ 2-винилпиридином, после чего определяют скорость реакции в описанной выше инкубационной среде. Расчет содержания общего и окисленного глутатиона производят с помощью калибровочных графиков, для построения которых растворы GSH и GSSG («Sigma», США) в концентрации от 3 до 100 мкМ обрабатывают аналогично опытным пробам. Концентрацию GSH рассчитывают как разницу между концентрацией общего глутатиона и GSSG, выражая результат в нмоль/мг белка.

Концентрацию белка в лимфоцитах крови определяют методом [A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford // *Analyt. Biochem.* - 1976. - Vol.7, №1, 2. - P.248-254], основанным на взаимодействии Кумасси голубого G-250 с остатками аргинина и лизина в белках. Свободный краситель красного цвета (максимум поглощения - 495 нм) при образовании комплекса с белком переходит в синюю форму (максимум поглощения - 595 нм).

К 0,1 мл лизата лимфоцитов крови добавляют 1,0 мл раствора Кумасси голубого (100 мг красителя, 50 мл 96° этанола, 100 мл 85% Н₃Р₄, Н₂О до 1,0 л), перемешивают, инкубируют 3 мин при комнатной температуре и измеряют оптическую плотность проб (длина волны 595 нм) против контроля, содержащего 0,1 мл воды и 1,0 мл раствора Кумасси голубого. Содержание белка рассчитывают по калибровочной кривой, построенной по разведениям стандартного раствора альбумина (1,0 мг/мл) и выражают в мг/мл.

В настоящее время крайне важно для оценки эффективности антиоксидантной активности оценить уровень восстановленного глутатиона и осуществить стимуляцию антиоксидантной активности, а затем оценить ее эффективность. Для решения этой задачи предложен новый способ оценки эффективности стимуляции антиоксидантной активности после дополнительного добавления в инкубационную среду 1,4-дитиозритритола и аскорбиновой кислоты.

Все сказанное свидетельствует о крайней важности разработки способа оценки эффективности стимуляции антиоксидантной активности для защиты клеток от токсического действия активных форм кислорода.

Популярность указанного выше способа обоснован его высокой чувствительностью, простотой осуществления и достаточной адекватностью получаемых результатов, лежащих в основе определения восстановленного глутатиона.

Существенные признаки, характеризующие изобретения проявили в заявленной совокупности новые свойства, явным образом не вытекающие из уровня техники в данной области, и не являются очевидными для специалиста.

Идентичной совокупности признаков не обнаружено при изучении патентной и научной медицинской литературы.

Данное изобретение может быть использовано в медицинской практике для повышения точности оценки эффективности стимуляции антиоксидантной активности при различных заболеваниях. Таким образом, следует считать предлагаемое изобретение соответствующим условиям патентоспособности: «новизна», «изобретательский уровень», «промышленная применимость».

Метод основан на определении восстановленного глутатиона.

Способ осуществляется следующим образом поэтапно:

1. Выделение лимфоцитов крови из венозной крови.

Пробирки с венозной гепаринизированной кровью (25 Ед./мл) выдерживали при температуре 37°С в течение 40 минут для отделения плазмы и эритроцитов. Затем пробирки переносят в стерильный ламинарный шкаф для выполнения процедуры выделения лимфоцитов крови. Полученную плазму наслаивают на градиент плотности Ficoll-Paque («Pharmacia», Швеция) ($\rho=1,077 \text{ г/см}^3$) в соотношении 1:2 и центрифугируют при 500 g в течение 20 минут [Bignold L.P., 1987]. После центрифугирования собирают образовавшееся интерфазное кольцо из смеси мононуклеарных клеток в стерильную центрифужную пробирку с 4,5 мл питательной среды ((90% RPMI-1640 («Вектор-Бест», Россия), 10% эмбриональной телячьей сыворотки («Биолот», Россия), инактивированной при температуре 56°С в течение 30 мин, 0,3 мг/мл L-глутамина («Борисовский ЗМП», Беларусь), 100 мкг/мл гентамицина, 2 ммоль/мл HEPES («Flow», Великобритания)), затем центрифугируют 10 минут при 500 g. Процедуру отмывки повторяют дважды: последовательно ресуспендируя клетки и затем центрифугируя в течение 10 минут при 500 g. Выделение лимфоцитов из мононуклеарной фракции клеток проводят на двойном градиенте Перколла [Ulmer

А.Л., 1979]. Стандартный изотонический раствор Перколл (SIP) получают смешиванием одного объема 10х PBS (фосфатно-солевого буфера (pH 7,4)) с девятью объемами Перколл («Sigma», США) (плотность полученного раствора - 1,130 г/мл). Затем готовят 47,5% стандартный изотонический раствор Перколл (47,5% SIP) и 15,0% стандартный изотонический раствор Перколл (15,0% SIP). К клеточной суспензии добавляют 1,5 мл SIP (4°C), перемешивают и переносят в новую стерильную пробирку. Сверху наслаивают 5 мл 47,5% SIP (4°C). Создают верхнюю фазу посредством 2 мл 15,0% SIP (4°C). Центрифугируют при 1500 g и 4°C 45 минут. Собирают интерфазное кольцо (лимфоцитарную фракцию клеток). Объем доводят до 5 мл питательной средой ((90% RPMI-1640 («Вектор-Бест», Россия), 10% эмбриональной телячьей сыворотки («Биолот», Россия), инактивированной при температуре 56°C в течение 30 мин, 0,3 мг/мл L-глутамин («Борисовский ЗМП», Беларусь), 100 мкг/мл гентамицин, 2 ммоль/мл HEPES («Flow», Великобритания)), температура раствора должна соответствовать 37°C. Далее проводят центрифугирование при 700 g и 20°C в течение 10 минут. Затем удаляют супернатант до конечного объема 1 мл.

2. Количественное определение численности жизнеспособных лимфоцитов крови с помощью окраски трипановым синим микроскопическим методом.

Лимфоциты крови ресуспендируют в 1 мл клеточной взвеси. Отбирают 100 мкл ресуспендированной клеточной суспензии и добавляют 100 мкл 0,1% раствора трипанового синего на физрастворе, хорошо перемешивают и заполняют камеру Горяева. Предварительно к камере притирают покровное стекло так, чтобы появлялись радужные, ньютоновы кольца (только при этих условиях соблюдался правильный объем камеры). Каплю клеточной взвеси с красителем вносят под притертое покровное стекло. Подсчет клеток производят в 5-ти больших квадратах по диагонали камеры Горяева. Расчет клеточности лимфоцитов крови производят по формуле:

$$A \times 10^6 = (\text{число клеток}) / 4$$

где, А - клеточность лимфоцитов крови.

3. Внесение в инкубационную смесь заявленных добавок.

В культуральную смесь добавляют соединения: 1,4-дигидроэритритол в концентрации 5 мМ и аскорбиновую кислоту в конечной концентрации 0,14 мМ.

4. Биохимическое исследование восстановленного глутатиона.

Лизат лимфоцитов готовят на 5% сульфосалициловой кислоте, которая осаждает белки, но не ингибирует активность глутатионредуктазы. Количество общего глутатиона (GSH и GSSG) определяют в пробе содержащей 0,1 М Na-фосфатный буфер (pH=7,5) с 1 мМ ЭДТА, 0,4 мМ НАДФН2, 0,3 мМ ДТНБ и 1 U/мл глутатионредуктазы («Wako», Япония). Окисленный глутатион определяют аналогичным способом в клеточном лизате после предварительной инкубации пробы в течение 30 мин с 10 мМ 2-винилпиридином. Расчет содержания общего и окисленного глутатиона производят с помощью калибровочных графиков, для построения которых используют растворы GSH и GSSG («MP», США) в концентрации от 3 до 100 мкМ, обработанные аналогично опытным пробам. Концентрацию GSH рассчитывают как разницу между концентрацией общего глутатиона и GSSG, выражая результат в нмоль/мг белка.

Исследование антиоксидантной активности по способу-прототипу и предлагаемому способу выполнялось 40 раз. Результаты исследования обработаны статистически с использованием пакета программ Stat Soft Statistica 6.0.

При проведении исследования по способу-прототипу уровень восстановленного глутатиона составил $0,75 \pm 0,06$ нмоль/мг белка, а при оценке по предлагаемому способу в случае эффективной стимуляции антиоксидантной активности уровень восстановленного глутатиона составил $0,92 \pm 0,08$ нмоль/мг белка, а в случае не эффективной стимуляции антиоксидантной активности уровень восстановленного глутатиона составил $0,80 \pm 0,07$ нмоль/мг белка (табл.1). То есть при эффективной стимуляции антиоксидантной активности уровень восстановленного глутатиона возрастает на 19% и более, а при неэффективной стимуляции антиоксидантной активности уровень восстановленного глутатиона увеличивается менее чем на 5%.

Полученные результаты уровня восстановленного глутатиона соответствующим данным литературы [Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н., 2005].

Итак, при применении способа-прототипа был получен недостаточно точный результат, не позволивший установить эффективность стимуляции антиоксидантной активности, что связано с отсутствием биохимической стимуляции процесса, а наиболее эффективным и точным был предлагаемый способ.

При этом предлагаемый способ прост в исполнении и интерпретации полученных результатов.

	Таблица 1
Оценка эффективности стимуляции антиоксидантной активности	
Определение GSH по предлагаемому способу	

Определение GSH по способу-прототипу	После стимуляции с ростом GSH		
	До стимуляции	До 0,90 нмоль/мг белка и более	До 0,08 нмоль/мг белка и менее
n=40	n=40	n=34	n=6
0,73±0,07 нмоль/мг белка	0,75±0,06 нмоль/мг белка	0,92±0,08 нмоль/мг белка	0,803±0,07 нмоль/мг белка

Формула изобретения

Способ оценки эффективности стимуляции антиоксидантной активности путем определения концентрации восстановленного глутатиона, отличающийся тем, что дополнительно добавляют в инкубационную среду 1,4-дитиоэритритол и аскорбиновую кислоту и при увеличении уровня восстановленного глутатиона с 0,75 нмоль/мг белка до 0,90 нмоль/мг белка и более стимуляцию антиоксидантной системы оценивают как эффективную, а при росте уровня восстановленного глутатиона с 0,75 нмоль/мг белка до 0,80 нмоль/мг белка и менее стимуляцию антиоксидантной активности оценивают как неэффективную.

ИЗВЕЩЕНИЯ

ММ4А Досрочное прекращение действия патента из-за неуплаты в установленный срок пошлины за поддержание патента в силе

Дата прекращения действия патента: **05.04.2015**

Дата публикации: [20.11.2015](#)