



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2013128050/15, 18.06.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
18.06.2013

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 18.06.2013

(45) Опубликовано: 20.09.2014 Бюл. № 26

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: М.В. Кручинина и др. ЯМР-спектроскопия эритроцитов у больных с патологией печени. Ж. "Клинические и экспериментальная гастроэнтерология", приложение Гепатология, 2003. - №2. - с.28-33. . Бондарь Ольга Петровна. Структурные особенности мембран эритроцитов с различным содержанием холестерина в норме и при развитии атеросклероза. Автореферат (см. прод.)

Адрес для переписки:

664049, г.Иркутск, Юбилейный, 100, а/я 15,
ФГБУ "НЦРВХ" СО РАМН, патентоведу

(72) Автор(ы):

Горохова Виктория Григорьевна (RU),
Кузнецова Эмма Эфраимовна (RU),
Чашкова Елена Юрьевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное учреждение "Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии" Сибирского отделения Российской академии медицинских наук (ФГБУ "НЦРВХ" СО РАМН) (RU)

(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТРУКТУРНОГО СОСТОЯНИЯ МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТОВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, в частности к биохимии. Способ осуществляют следующим образом. Из пробы крови эритроциты отмывают физиологическим раствором, после чего центрифугируют, затем экстрагируют смесью хлороформ-метанол, взятых в соотношении 1:2, при этом периодически встряхивают, а соотношение проба:экстрагент составляет 0,1:2,0. Далее экстракт эритроцитов и стандарты фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина наносят на хроматографическую пластинку с сорбентом сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ, которую помещают в хроматографическую камеру с элюентом состава - хлороформ:метанол:ледяная уксусная кислота:вода, взятых в соотношении 60:50:1:4. Через 10-15 минут хроматографическую

пластинку извлекают, высушивают и затем проявляют в парах йода. По длине пробега пятен пробы в сравнении с длиной пробега пятен стандартов идентифицируют фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин в пробе. При превышении размера пятна фосфатидилэтаноламина по сравнению с пятном фосфатидилхолина устанавливают нарушение структуры мембраны эритроцитов. Способ позволяет установить нарушение структуры мембраны эритроцита, что дает возможность улучшить диагностику заболевания на клеточном уровне и осуществлять контроль за эффективностью проводимого лечения. 3 пр., 1 табл.

RU 2 528 909 C1

C1 606099 2528909 RU

(56) (продолжение):

диссертации, Киев, 1984. Найдено из Интернет 22.04.2014, <http://www.dissercat.com/content/strukturnye-osobennosti-membran-eritrotsitov-s-razlichnym-soderzhanie-kholesterina-v-norme-#ixzz2zbbO1KFZ>. RU 2234087 C2, 10.08.2004. SU 1727080 A1, 15.04.1992. RU 2234088 C2, 10.08.2004. А.М. Казеннов, М.Н. Маслова. Структурно-биохимические свойства безъядерных эритроцитов. // Физиол. ж. СССР им. И.М. Сеченова. - 1987. - Т 73, N12 - с.1587-1594

R U 2 5 2 8 9 0 9 C 1

R U 2 5 2 8 9 0 9 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2013128050/15, 18.06.2013**(24) Effective date for property rights:
18.06.2013

Priority:

(22) Date of filing: **18.06.2013**(45) Date of publication: **20.09.2014** Bull. № 26

Mail address:

**664049, g.Irkutsk, Jubilejnyj, 100, a/ja 15, FGBU
"NTsRVKh" SO RAMN, patentovedu**

(72) Inventor(s):

**Gorokhova Viktorija Grigor'evna (RU),
Kuznetsova Ehmma Ehfrimovna (RU),
Chashkova Elena Jur'evna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federal'noe gosudarstvennoe bjudzhetnoe
uchrezhdenie "Nauchnyj tsentr rekonstruktivnoj
i vosstanovitel'noj khirurgii" Sibirskogo
otdelenija Rossijskoj akademii meditsinskikh
nauk (FGBU "NTsRVKh" SO RAMN) (RU)**(54) **METHOD OF DETERMINING STRUCTURAL STATE OF ERYTHROCYTE MEMBRANE**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: method is implemented as follows.
The erythrocytes from the blood sample are washed with physiological saline, then centrifuged, then extracted with chloroform-methanol mixture in the ratio 1: 2, at that shaken periodically, and the ratio of sample: extractant is 0.1: 2.0. Then the extract of erythrocytes and standards of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine are applied to the chromatographic plate with the sorbent Sorbfil PTSH-AF-A-UF, which is placed in a chromatography chamber with eluent of composition - chloroform: methanol:glacial acetic acid:water taken in a ratio of 60:50:1:4. After 10-15 minutes the chromatographic plate is removed, dried and then developed in iodine

vapour. The phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in the sample are identified according to the path length of the sample spots compared to the path length of standard spots. In case of exceeding the spot size of phosphatidylethanolamine compared to the spot of phosphatidylcholine the damage of the structure of the erythrocyte membrane is determined.

EFFECT: method enables to determine the damage of the erythrocyte membrane structure, which enables to improve the diagnosis of the disease at the cellular level and to carry out monitoring of the efficiency of treatment.

3 ex, 1 tbl

Изобретение относится к области медицины, а именно к биохимии, и может быть использовано в практическом здравоохранении для определения функциональной активности эритроцитов и для контроля за эффективностью проводимого лечения, а также в фундаментальных медицинских исследованиях.

5 Известно, что плазматическая мембрана эритроцита - важнейшая составляющая клетки, координирующая ее работу в зависимости от поступающих физических и химических сигналов (А.М. Казеннов, М.Н. Маслова. Структурно-биохимические свойства безъядерных эритроцитов. // Физиол. ж. СССР им. И.М. Сеченова. - 1987. - Т 73, №12 - с.1587-1594).

10 Известны различные способы определения структурного состояния мембраны клетки. Так, известен способ определения состояния мембраны эритроцитов по количеству гликопротеидов, формирующих примембранный слой клетки. Данный способ включает окраску мазков крови паральдегид-фуксином с последующим определением оптической плотности окрашенного комплекса при длине волны 580 нм (Ю.В. Постнов, К.А. 15 Фофанова. Гетерогенность эритроцитов по данным гистохимического выявления гликопротеидов, особенности ее при гипертонической болезни и экспериментальных гипертониях. // Тер. архив. - 1979, №6, с.29-33). Уменьшение величины оптической плотности свидетельствует о снижении содержания гликопротеидов и тем самым характеризует повреждение примембранного слоя клетки.

20 К существенному недостатку данного способа следует отнести то, что он не позволяет оценить структурное состояние мембраны эритроцитов, а оценивает только состояние внешнего примембранного слоя.

Также к недостаткам данного способа следует отнести длительность его осуществления, т.к. для получения устойчивого окрашенного комплекса требуется 25 более суток.

Наиболее близким по технической сущности к предлагаемому является способ определения структурного состояния мембраны эритроцитов, включающий взятие 30 пробы крови, отделение эритроцитов трехкратным отмыванием и центрифугированием, получение суспензии эритроцитов и определение фосфорсодержащих компонентов в них методом ЯМР-спектроскопии на водородных ядрах.

Известный способ осуществляют следующим образом. Проводят взятие пробы крови в пробирку с 3,8% цитрата натрия. Плазму от форменных элементов отделяют 35 центрифугированием. Эритроциты трижды отмывают фосфатным буфером, каждый раз центрифугируя по 5 мин при 3000 оборотов в минуту. Полученную суспензию эритроцитов вносят в ампулу и регистрируют спектр на ЯМР-спектрометре. Полученные спектры с помощью компьютерной программы интерпретируют (М.В. Кручинина, С.А. Курилович, И.В. Поруликова, И.И. Шакиров. ЯМР-спектроскопия эритроцитов у больных с патологией печени. Ж. «Клиническая и экспериментальная гастроэнтерология», приложение Гепатология, 2003. - №2. - с.28-33).

40 К недостаткам известного способа, выбранного в качестве прототипа, следует отнести то, что он позволяет качественно идентифицировать только фосфатидилхолин (ФХ) - основного фосфолипида мембраны и требует обязательного подтверждения его содержания другими химическими методами.

Хотя известно, что в эритроцитарной мембране внутренний монослой липидной 45 компоненты содержит около 20% фосфатидилэтанолина, а внешний с содержанием 23% фосфатидилхолина, которые должны отвечать постоянному их соотношению для сохранения поверхностной архитектоники мембраны и для обеспечения полноценной функциональной активности эритроцита (Э. Сим. Биохимия мембран. Москва, Мир, -

1983, - с.35).

Также к недостаткам данного способа следует отнести и то, что определение других фосфолипидов мембраны эритроцита требует дополнительного увеличения количества анализируемого образца и времени накопления его сигнала на спектре. Следовательно, только по определению фосфатидилхолина невозможно оценить структурное состояние мембраны.

Кроме этого, недостаток ЯМР определения состоит и в том, что по своей чувствительности он значительно уступает методам оптической спектроскопии и хроматографии (Т.Н. Колополова, Н.М. Сергеев, А.Ю. Корольков. Количественное определение концентрации метаболитов в моче человека методом спектроскопии ЯМРН. Биомедицинская химия, 2008, т.54, вып.2, с.223-235). Поэтому для повышения чувствительности ЯМР-метода используют прием накопления спектра, что, в свою очередь, увеличивает время анализа до суток.

Также к недостаткам известного способа следует отнести высокую стоимость ЯМР анализа, т.к. используется дорогостоящее оборудование, специально обустроенное помещение и привлечение подготовленного специалиста для интерпретации спектров.

Задачей заявляемого технического решения является разработка способа определения структурного состояния мембраны эритроцитов.

Техническим результатом предлагаемого способа является оценка состояния мембраны эритроцитов, за счет определения количественного содержания основных липидных компонентов эритроцитарной мембраны - фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина, а также сокращение времени анализа.

Технический результат достигается тем, что способ определения структурного состояния мембраны эритроцитов включает взятие пробы крови, отделение эритроцитов трехкратным отмыванием и центрифугированием, получение суспензии эритроцитов и определение фосфорсодержащих компонентов в них.

Отличия предлагаемого способа заключаются в том, что эритроциты отмывают физиологическим раствором и центрифугируют, затем экстрагируют смесью хлороформ-метанол, взятых в соотношении 1:2, при этом смесь периодически встряхивают, а соотношение проба:экстрагент составляет 0,1:2. Далее экстракт эритроцитов и стандарты фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина наносят на хроматографическую пластинку с сорбентом сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ, которую помещают в хроматографическую камеру с элюентом состава - хлороформ:метанол:ледяная уксусная кислота:вода, взятых в соотношении 60:50:1:4. Через 10-15 минут хроматографическую пластинку извлекают, высушивают, проявляют в парах йода. По длине пробега (Rf) пятен пробы в сравнении с длиной пробега пятен стандартов идентифицируют фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин в пробе.

К отличительным приемам заявляемого способа также относят и то, что проводят сравнение размера пятна фосфатидилэтаноламина пробы с размером пятна фосфатидилхолина пробы и, если размер пятна фосфатидилэтаноламина превышает размер пятна фосфатидилхолина, устанавливают нарушение структуры мембраны эритроцита.

Проведенный сопоставительный анализ с прототипом показал, что предлагаемый способ отличается от известного вышеперечисленными приемами и, следовательно, соответствует критерию изобретения «новизна».

Из проведенного анализа патентной и специальной литературы установлено, что предлагаемый способ имеет признаки, отличающие его не только от прототипа, но и других технических решений в данной и смежных областях медицины. В доступной

литературе авторами предлагаемого технического решения не выявлено способа определения структурного состояния мембраны эритроцитов с использованием приемов заявляемого способа.

5 Отмывание эритроцитов физиологическим раствором позволяет удалить другие форменные элементы крови и сохранить исходную рН среды.

Авторами предлагаемого способа экспериментальным путем определено, что экстракция смесью хлороформ-метанол, взятых в соотношении 1:2, при периодическом встряхивании и соотношении проба:экстрагент 0,1:2,0 позволяет эффективно извлечь фосфолипиды ФХ и ФЭ из мембраны эритроцитов.

10 Также авторами заявляемого способа установлено, что проведение тонкослойной хроматографии с элюентом хлороформ:метанол:ледяная уксусная кислота:вода, взятых в соотношении 60:5:1:4, с последующим проявлением в прах йода, создает условия для эффективного разделения по длинам пробега ФХ и ФЭ на хроматографической пластинке.

15 Сравнение Rf ФХ и ФЭ с Rf пятен стандартов позволяет точно идентифицировать их в пробе, а по превышению размера пятна ФЭ пробы по сравнению с размером пятна ФХ пробы устанавливается нарушение структурного состояния мембраны эритроцитов.

Клинические исследования авторов заявляемого способа свидетельствуют о том, что использование предлагаемого технического решения позволяет определить
20 количественное содержание основных липидных компонентов эритроцитарной мембраны - фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина, а также сократить время выполнения анализа до 30-40 минут.

Изложенное позволяет сделать вывод о соответствии технического решения критерию «изобретательный уровень».

25 Способ, составляющий заявляемое изобретение, предназначен для использования в медицине, а именно в биохимии. Возможность его осуществления подтверждена описанными в заявке приемами, и, следовательно, предлагаемое решение соответствует критерию изобретения «промышленная применимость».

Заявляемый способ осуществляется следующим образом.

30 Утром (натощак) у пациента из локтевой вены забирают кровь в пробирку, содержащую 3,8% раствор цитрата натрия. Плазму от форменных элементов отделяют центрифугированием. Эритроциты отмывают физиологическим раствором с трехкратным центрифугированием по 5 мин каждое при 3000 об/мин. К 100 мкл суспензии эритроцитов прибавляют 2 мл смеси хлороформ-метанол (1:2 по объему),
35 проводят экстракцию при периодическом встряхивании. При этом соотношение проба:экстрагент составляет 0,1:2,0.

Экстракт эритроцитов микропипеткой наносят на хроматографическую пластинку (сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ), которую помещают в стеклянную хроматографическую камеру с элюентом состава - хлороформ:метанол:ледяная уксусная кислота:вода, взятых
40 в соотношении 60:50:1:4 (по объему). На пластинку также наносят стандарты фосфолипидов ФХ и ФЭ. Через 10-15 мин пластинку вынимают из камеры, сушат на воздухе и затем проявляют в парах йода. Появившиеся коричневые пятна на пластинке сравнивают по длинам пробега (Rf) пятен образцов фосфолипидов, по которым и идентифицируют фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин. При превышении размера
45 пятна фосфатидилэтаноламина в пробе по сравнению с пятном фосфатидилхолина в этой же пробе устанавливается нарушение структуры мембраны эритроцита.

Предложенный способ поясняется примерами конкретного выполнения.

Пример №1. Больной А., история болезни №34126, поступил в проктологическое

отделение ФГБУ «НЦ РВХ» СО РАМН с диагнозом: болезнь Крона. При поступлении было проведено клиническое и лабораторное обследование. Выявлено: снижение количества эритроцитов, гемоглобина, гематокрита; из биохимических показателей: отмечено уменьшение содержания общего белка, альбумина, увеличение индекса

5 эндогенной интоксикации, процентного содержания мембрансвязанного гемоглобина, сорбционной способности эритроцитов. Также было установлено изменение содержания макроэргических соединений в мембране и показателя устойчивости эритроцитов. Все это сопровождалось выраженной гистологической активностью воспалительного процесса в слизистой оболочке толстой кишки.

10 При осуществлении заявляемого способа в крови пациента установлено содержание ФХ - 14,15 и ФЭ - 22,0. Повышенное содержание фосфатидилэтаноламина (ФЭ) свидетельствовало о нарушении структурного состояния мембраны эритроцитов.

Проведенное стандартное лечение с привлечением антицитокиновой терапии (инфликсимаб) значительно улучшило клиническое состояние больного и

15 сопровождалось положительной динамикой большинства лабораторных показателей, за исключением показателя устойчивости эритроцитов и содержания фосфолипидов. Уровень ФЭ составил 20,0; ФХ - 18,0. Это указывало на то, что эффективного восстановления мембраны эритроцита не произошло и потребовало включения в комплекс лечения мембранотропных препаратов.

20 Пример №2. Больная П., история болезни №24117, поступила в стационар клиники ФГБУ «НЦ РВХ» СО РАМН с диагнозом - распространенный гнойный перитонит. Состояние больной при поступлении тяжелое. Лабораторные показатели подтвердили выраженность тяжести эндогенной интоксикации: высокий лейкоцитоз, высокое содержание белков острой фазы, резкое снижение общего белка, альбумина и его

25 эффективной концентрации, увеличение содержания печеночных ферментов.

Заявляемым способом в крови больной определено содержание ФЭ - 22,7; ФХ - 14,0. Это указывало на нарушение структуры мембраны эритроцита и коррелировало с высоким содержанием метаболического пула сыворотки крови и эритроцитов, а также с выраженной полиорганной недостаточностью.

30 Хирургическое пособие, многократная санация брюшной полости и активная лекарственная терапия сопровождались улучшением клинического состояния больной, реологических и биохимических показателей крови. После проведенного лечения содержание ФЭ - 21,0; ФХ - 17,5. Полученные показатели ФЭ и ФХ свидетельствовали о сохраняющемся нарушении структуры липидного бислоя мембраны эритроцита, что

35 коррелировало с сохраняющимися нарушениями функционального состояния основных органов детоксикации (печени и почек).

Пример №3. Волонтер К. Содержание ФХ и ФЭ в пробе крови составило: ФХ - 22,5, ФЭ - 19,0. Основные биохимические и реологические показатели крови не превышали референтных значений. Субъективно и объективно состояние волонтера не указывало

40 на наличие какой-либо патологии. Показатели исследованных фосфолипидов также были в пределах нормы и не выявили нарушений на клеточном уровне.

В лаборатории биохимии ФБГУ «НЦ РВХ» СО РАМН были исследованы образцы крови 30 человек, из них: 18 - проктологические больные (болезнь Крона и язвенный колит); 5 - с распространенным гнойным перитонитом; 7 - гематологические больные

45 (лимфома, железодефицитная анемия).

Полученные данные о содержании фосфолипидов в мембране эритроцитов этих больных представлены в нижеприведенной таблице.

Таблица

Обследуемые	Содержание фосфатидилхолина в %	Содержание фосфатидилэтаноламина в %
Проктологические больные n=18	14,12±0,03	21,8±0,18
Перитонит n=5	14,23±0,02	22,84±0,02
Гематологические больные n=7	13,79±0,012	23,7±0,01
Волонтеры n=15	22,8±0,15	19,85±0,16

Авторами установлено, что у обследуемых больных количество фосфатидилэтаноламина превышало содержание фосфатидилхолина в крови. Это свидетельствует о нарушении структуры липидного бислоя, что приводит к изменению формы эритроцита и снижению его функциональной активности. В то же время у практически здоровых людей - волонтеров показатели этих фосфолипидов были в пределах нормы, что подтверждало отсутствие нарушений на клеточном уровне.

Таким образом, заявляемый способ позволяет установить нарушение структуры мембраны эритроцита и тем самым дает возможность улучшить диагностику заболевания на клеточном уровне, а также осуществлять контроль эффективности проводимого лечения и обоснованно дополнять комплекс лечения мембранотропными препаратами.

Формула изобретения

Способ определения структурного состояния мембраны эритроцитов, включающий взятие пробы крови, отделение эритроцитов трехкратным отмыванием и центрифугированием, получение суспензии эритроцитов и определение фосфорсодержащих компонентов в них, отличающийся тем, что эритроциты отмывают физиологическим раствором и центрифугируют, затем экстрагируют смесью хлороформ-метанол, взятых в соотношении 1:2, при этом периодически встряхивают, а соотношение проба:экстрагент составляет 0,1:2,0, далее экстракт эритроцитов и стандарты фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина наносят на хроматографическую пластинку с сорбентом сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ, которую помещают в хроматографическую камеру с элюентом состава - хлороформ:метанол:ледяная уксусная кислота:вода, взятых в соотношении 60:50:1:4, через 10-15 минут хроматографическую пластинку извлекают, высушивают, проявляют в парах йода и по длине пробега пятен пробы в сравнении с длиной пробега пятен стандартов идентифицируют фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин пробы, а по превышению размера пятна фосфатидилэтаноламина по сравнению с пятном фосфатидилхолина устанавливают нарушение структуры мембраны эритроцитов.