



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **116929** (13) **U**  
(51) МПК (2017.01)

**G01N 1/00**

**G01N 21/39** (2006.01)

**G01N 21/64** (2006.01)

**G01N 33/49** (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО  
ЕКОНОМІЧНОГО  
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: <b>u 2016 13086</b></p> <p>(22) Дата подання заявки: <b>21.12.2016</b></p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>12.06.2017</b></p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>12.06.2017, Бюл.№ 11</b></p>	<p>(72) Винахідник(и): <b>Шевцова Алла Іванівна (UA), Ткаченко Вікторія Андріївна (UA), Коваль Олена Акіндинівна (UA), Скоромна Анастасія Сергіївна (UA), Іванов Андрей Петрович (UA)</b></p> <p>(73) Власник(и): <b>ДЕРЖАВНИЙ ЗАКЛАД "ДНІПРОПЕТРОВСЬКА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ МІНІСТЕРСТВА ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ", вул. Дзержинського, 9, м. Дніпропетровськ, 49044 (UA)</b></p>
--	--

## (54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ КІНЦЕВИХ ПРОДУКТІВ ГЛІКАЦІЇ В ПЛАЗМІ КРОВІ

### (57) Реферат:

Спосіб визначення флуоресціюючих кінцевих продуктів глікації (фКПГ) в плазмі крові включає визначення інтенсивності флуоресценції зразків плазми крові, розведених в 50 разів забуференим фізіологічним розчином з рН 7,4, при використанні хвилі екстинкції 350 нм та хвилі емісії 440 нм. При цьому, інтенсивність флуоресценції розчину глікованого альбуміну з концентрацією 1 мг/мл (Фа) та дослідних зразків (Фд) плазми крові, розведених в 10 разів фізіологічним розчином, вимірюють відносно стандартного розчину хініну гідрохлориду, рівень флуоресценції у якому прийнятий за 1000 умовних одиниць (ум. од.), і за співвідношенням Фд/Фа розраховують кількість фКПГ.

UA 116929 U



Корисна модель належить до біології і медицини, а саме до способів визначення кінцевих продуктів глікації в плазмі крові, що може бути корисним у лабораторній діагностиці патологічних станів, оцінці побічних ефектів лікарських засобів та при проведенні науково-дослідних робіт.

5 Кінцеві продукти глікації (КПГ) - результат неферментативної реакції між редуруючими вуглеводами та аміногрупами білків, фосфоліпідів і нуклеїнових кислот. На сьогодні описані різні за структурою типи КПГ, серед яких можна виділити такі, що флуоресціюють (пентозидин, піропіридин, весперлізин та ін.), та не флуоресціюючі КПГ (карбоксиметиллізин, піралін, імідазолони та ін.).

10 Раніше вважалось, що тільки за умов довготривалої гіперглікемії активуються процеси глікації і утворюються флуоресціюючі КПГ, але на сьогодні вже доведено, що різні патологічні стани (новоутворення, серцево-судинні захворювання, ураження нирок та інші) супроводжуються формуванням зазначених продуктів, причому їх кількість та якісний склад відрізняються в залежності від типу патологічного процесу та ступеня ураження тканин. Отже, визначення рівня КПГ в біологічних зразках може бути додатковим показником розвитку патологічного стану.

Відомий спосіб визначення КПГ шляхом вимірювання аутофлуоресценції ділянки шкіри за допомогою приладу TruAge Scanner™ (Morinda, Orem, UT, USA), що був запропонований для ідентифікації накопичення кінцевих продуктів глікації у хворих на цукровий діабет з серцево-судинними ускладненнями та ураженням нирок (Yatnagishi S., Fukami K., Matsui T. Evaluation of tissue accumulation levels of advanced glycation end products by skin autofluorescence: A novel marker of vascular complications in high-risk patients for cardiovascular disease// International Journal of Cardiology. - 2015. - 185. - P. 263-268). Недоліком цього методу є висока вартість обладнання та його недостатня чутливість.

25 Більшість відомих на сьогодні способів визначення флуоресціюючих КПГ базується на вимірюванні інтенсивності флуоресценції зразків сироватки крові за умов використання хвилі збудження 370 нм та хвилі емісії 445 нм (Munch G., Keis R., WeBels A., Riederer P., Bahner U., Heidland A., Niwa T., Lemke H., Schinzel R. Determination of advanced glycation end products in serum by fluorescence spectroscopy and competitive ELISA. Eur J Clin Chem Clin Biochem. - 1997. - 35(9). - P.669-677).

30 Найбільш близьким до запропонованого способу визначення флуоресціюючих КПГ є метод вимірювання аутофлуоресценції сироватки крові (Kalousova M, Zima T, Tesar V, Lachmanova J. Advanced glycation end products and advanced oxidation protein products in hemodialyzed patients. Blood Purif. - 2002. - V.20. - P.531-536), згідно якому кількість КПГ оцінюється в умовних одиницях за інтенсивністю флуоресценції зразків сироватки крові, розведених у 50 разів забуференим фізіологічним розчином з рН 7,4, при використанні хвилі екстинкції 350 нм та хвилі емісії 440 нм.

Недоліком цього методу є відсутність калібрувального стандартного розчину білка, що містить певну кількість КПГ.

40 В основу корисної моделі поставлена задача удосконалення способу визначення флуоресціюючих кінцевих продуктів глікації (фКПГ) у плазмі та сироватці крові при різноманітних патологічних етапах. Поставлена задача вирішується тим, що у запропонованому способі визначення флуоресціюючих КПГ, що включає визначення інтенсивності флуоресценції зразків плазми крові, розведених в 50 разів забуференим фізіологічним розчином з рН 7,4, при використанні хвилі екстинкції 350 нм та хвилі емісії 440 нм, який відрізняється тим, що інтенсивність флуоресценції розчину глікованого альбуміну з концентрацією 1 мг/мл (Фа) та дослідних зразків (Фд) плазми крові, розведених в 10 разів фізіологічним розчином, вимірюють відносно стандартного розчину хініну гідрохлориду, рівень флуоресценції у якому прийнятий за 1000 умовних одиниць (ум. од.), і за співвідношенням Фд/Фа розраховують кількість фКПГ.

50 Перелік фігур креслення

Креслення. Рівень флуоресціюючих кінцевих продуктів глікації (фКПГ) в плазмі крові здорових донорів різного віку, пацієнтів з гострим коронарним синдромом та серцево-судинною недостатністю.

- 55 1 - умовно здорові донори (18-26 років, n=10);  
 2 - умовно здорові донори (55-70 років, n=10);  
 3 - пацієнти з гострим коронарним синдромом (55-70 років, n=15);  
 4 - пацієнти з серцевою недостатністю (55-70 років, n=15).

Корисну модель, що заявляється, здійснюють наступним чином:

1. Готують водний розчин хініну гідрохлориду з концентрацією 0,06 мг/мл, рівень флуоресценції в якому за емісійним максимумом  $440 \pm 10$  нм після збудження хвилею  $350 \pm 10$  нм дорівнює 1000 умовних одиниць.

5 2. Готують розчин глікованого альбуміну (1 мг/мл) у фізіологічному розчині, використовуючи або комерційний препарат, або приготований в лабораторних умовах згідно методу Ledesma-Osuna L. I. et al. (2008).

10 3. Проводять калібрування флуориметра, використовуючи в якості негативного контролю фізіологічний розчин (Ф<sub>0</sub>), та стандартний розчин хініну гідрохлориду, приготований згідно п.1 (Ф<sub>1000</sub>). Всі вимірювання проводять за хвилину емісії  $440 \pm 10$  нм після збудження флуоресценції хвилею  $350 \pm 10$  нм.

4. Вимірюють флуоресценцію розчину глікованого альбуміну (п.2) та дослідних зразків (Ф<sub>д</sub>), розведених у 10 разів фізіологічним розчином, і розраховують їх співвідношення, визначаючи вміст флуоресціюючих кінцевих продуктів глікації, тобто

$$\text{фКПГ} = \text{Фд/Фа (мг/мл)}$$

15 Спосіб був апробований в умовах біохімічної лабораторії на достатньо великій кількості зразків. Кількість фКПГ визначали в плазмі крові умовно здорових молодих донорів віком 18-26 років (n=10, група 1), здорових донорів віком 55-70 років (n=10, група 2), хворих па гострі коронарні синдроми (n=15, група 3) та хворих на серцево-судинну недостатність (n=15, група 4). Як видно з наведених на Фіг. 1 результатів, кількість фКПГ залежить від віку людини та типу захворювання, тобто визначення фКПГ може бути корисним лабораторним показником в  
20 діагностиці патологічних станів та моніторингу ефективності лікувальних заходів. Метод може бути також корисним при тестуванні токсичності та побічних ефектів фармакологічних препаратів.

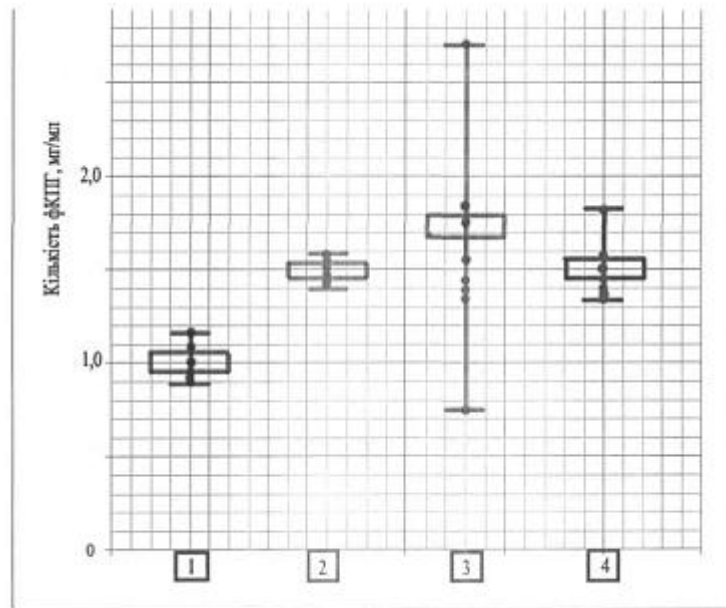
25 Запропонований метод визначення фКПГ характеризується високою чутливістю, простотою і доступністю реагентів і може бути використаний в клінічних та науково-дослідних лабораторіях. Перевагою способу у порівнянні з закордонними аналогами є отримання достовірних результатів досліджень при невеликих витратах на проведення експерименту.

30 Технічний результат, що досягається при використанні корисної моделі, визначається високоточною кількісною оцінкою рівня фКПГ в зразках плазми крові, можливістю пристосування методу для оцінки фКПГ в інших біологічних розчинах (сеча, гомогенати тканин, культуральне середовище, тощо), його доступністю у клінічних лабораторіях, що забезпечені флуориметрами з відповідними технічними характеристиками.

35 Розроблений спосіб відповідає умові "промислова придатність", що дозволяє кваліфікувати його як "корисну модель", яка може бути використана у наукових дослідженнях та в лабораторній діагностиці різноманітних патологічних станів.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

40 Спосіб визначення флуоресціюючих кінцевих продуктів глікації (фКПГ) в плазмі крові, що включає визначення інтенсивності флуоресценції зразків плазми крові, розведених в 50 разів забуференим фізіологічним розчином з рН 7,4, при використанні хвилі екстинкції 350 нм та хвилі емісії 440 нм, який **відрізняється** тим, що інтенсивність флуоресценції розчину глікованого альбуміну з концентрацією 1 мг/мл (Фа) та дослідних зразків (Ф<sub>д</sub>) плазми крові, розведених в 10 разів фізіологічним розчином, вимірюють відносно стандартного розчину хініну гідрохлориду,  
45 рівень флуоресценції у якому прийнятий за 1000 умовних одиниць (ум. од.), і за співвідношенням Ф<sub>д</sub>/Фа розраховують кількість фКПГ.



---

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

---

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