



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **99856** (13) **C2**
(51) МПК (2012.01)
G01N 27/00
G01N 33/49 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

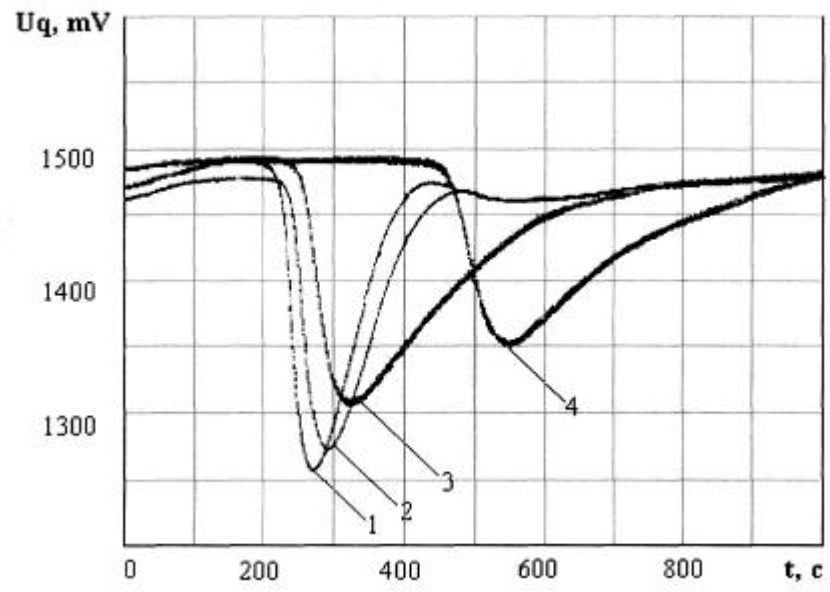
(21) Номер заявки: а 2010 12556	(72) Винахідник(и): Бойчук Тарас Миколайович (UA), Шаплавський Микола Володимирович (UA), Слободян Всеволод Зіновієвич (UA), Гуцул Оксана Всеволодівна (UA), Буждиган Василь Васильович (UA)
(22) Дата подання заявки: 25.10.2010	(73) Власник(и): БУКОВИНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ МОЗ УКРАЇНИ, пл.Театральна, 2, м.Чернівці, Чернівецька обл., 58002, Україна (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 10.10.2012	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: UA 31236 U; 25.03.2008 UA 35766 U; 10.10.2008 UA 36976 U; 10.11.2008 RU 2027188 C1; 20.01.1995 RU 2149403 C1; 20.05.2000 TR 201001281 A2; 21.07.2010
(41) Публікація відомостей про заявку: 25.04.2012, Бюл.№ 8	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.10.2012, Бюл.№ 19	

(54) АВТОМАТИЗОВАНИЙ БЕЗЕЛЕКТРОДНИЙ СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ЗАРЯДУ ЕРИТРОЦИТА

(57) Реферат:

Винахід належить до біології та медицини і може бути використаний у фундаментальних дослідженнях функцій еритроцитів, терапії за діагностики стану мікроциркуляції крові, контролі лікування та прогнозуванні. Автоматизований безелектродний спосіб вимірювання заряду еритроцита полягає у вимірюванні фізичних параметрів крові. Вимірювання проводять шляхом реєстрації добротності крові та її плазми. При цьому капсули з кров'ю та плазмою розміщують в коливальному контурі, який індуктивно зв'язують з біоінертним тефлоновим капілярним соленоїдом. Комплекс вимірювання з'єднують з комп'ютером, в який вводять клінічні дані відносно вмісту досліджуваних крові та її плазми. Далі зазначений капілярний соленоїд послідовно заповнюють досліджуваною кров'ю і визначають рівень її добротності та досліджуваною плазмою і також визначають її добротність, а за значеннями добротності досліджуваних крові та її плазми розраховують заряд еритроцита за відповідною формулою. Спосіб забезпечує підвищення точності і якості вимірювань та розширення області його застосування.

UA 99856 C2



Спосіб належить до біології та медицини і може бути використаний у фундаментальних дослідженнях функцій еритроцитів, терапії та діагностики стану мікроциркуляції крові, контролі лікування та прогнозуванні.

Нині реологічні параметри крові розглядаються як діагностичні та прогностичні ознаки, що характеризують її опір за кровообігу. Вважають, що заряд еритроцитів відіграє певну роль в зазначеному контексті.

Аналогом способу є визначення заряду мембрани еритроцитів на спектрофлуориметрі фірми Хітачі MPF-400 з використанням позитивно зарядженого зонда (Науменко Л.В. Поиск и изучение механизма действия производных ксантина, проявляющих гемореологические свойства: автореф. дис. на соискание ученой степени канд. мед. наук: 14.00.25. / Науменко Людмила Владимировна; ГОУ ВПО Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова. - М.: 2006. - 28 с). Принцип способу полягає у визначенні інтенсивності флуоресценції еритроцитів, що знаходяться у штучному середовищі.

Недоліком способу-аналога є те, що при утворенні комплексу зонда з від'ємно зарядженими молекулярними утвореннями глікокаліксу еритроцитів виявляється тільки інтенсивність флуоресценції в штучному середовищі, а не, власне, заряд, що за такого вимірювання не піддається адекватному чисельному виразу.

Прототипом способу є визначення електрофоретичної рухливості еритроцитів на цитоферометрі фірми "Opton" (Электрофоретическая подвижность эритроцитов как показатель оценки функциональной полноценности мембраны эритроцитов / Н. В. Пурло, О. В. Попова, Л. С. Бирюкова, Г. И. Козинец // Клиническая лабораторная диагностика. - 2005. - № 1. - С. 40 - 44.) Принцип способу полягає у визначенні швидкості руху еритроцитів у буферному розчині, що пропорційна величині їх заряду у штучному середовищі.

Недоліком прототипу є, зокрема, використання електродів, і постійного електричного струму, що здатні руйнувати енерготрансформаційні зв'язки біологічної тканини (Н. И. Губанов, А. А. Утепбергенов Медицинская биофизика. - М.: Медицина, 1978. - 336 с.) а, отже і дзета-потенціал.

В основу способу поставлено задачу удосконалити спосіб визначення заряду еритроцитів шляхом розробки фізичного методу аналізу, спрямованого на вимірювання заряду без електродів, змодельовавши при цьому *in vitro* умови *in vivo*, тобто, усунувши електростатичне зчеплення штучної оболонки з нативною кров'ю і таким чином зберегти умови формування дзета-потенціалу, що підвищує точність і якість вимірювання та розширює область застосування.

Для вирішення поставленої задачі використаний вимірювальний комплекс (Патент на корисну модель UA 31236. МПК G01N 11/00, G01N 27/00. Пристрій для автоматизованого вимірювання в'язкості біологічних рідин / Шаплавський М.В., Пішак В.П., Слободян О.В., Григоришин П.М., Микитюк О.Ю.: заявник та патентовласник БДМУ. - № 200714803; заявл. 26.12.2007; опубл. 25.03.2008. Бюл. № 6.). У вимірювальному комплексі, згідно з винаходом, використано біоінертний (гідрофобний) капіляр (Тефлон Ф-ЧДЕ, ООО "Анион-Спб").

Вихідними для розрахунку заряду еритроцитів є параметри імпульсів добротності цільної крові та її плазми, що візуалізуються на дисплеї при їх протіканні через біоінертний капіляр (див. креслення).

На кресленні показана залежність напруги, зв'язаної з добротністю (U_q , mV), від часу протікання складових крові (t , с), де 1, 3 – плазма і кров, відповідно, після лікування, а 2, 4 – плазма і кров, відповідно, до лікування астми.

Ознаки способу: кров, плазма, біоінертний капіляр, добротність (параметр електромагнетизму), заряд еритроцитів.

Спільними ознаками прототипу та способу, що заявляється, є вимірювання фізичних параметрів еритроцитів. Відмінності способу від прототипу наведені в таблиці.

Порівняння способу та прототипу за ознаками

Ознака	Спосіб, що заявляється	Прототип
Пристрій для вимірювання	Вимірювальний комплекс реологічних параметрів	Цитоферометр "Opton"
Параметри вимірів	добротність плазми та крові	електрофоретична рухливість
Біофізичний зміст параметра	параметр, що безпосередньо формується зарядом еритроцитів в аутологічній плазмі	параметр, що залежить від вмісту іоногенних груп еритроцитів та рН штучного середовища
Умови вимірювання заряду	відсутність електродів	дія електродів та постійного електричного поля
Кінцевий результат виміру	середній заряд еритроцита крові в Кулонах (Кл), або у ефективних (некомпенсованих) електронах	рухливість еритроцитів в $\text{мкм/см} \cdot \text{В}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$

Визначення термінів, що використовуються при описі винаходу: загальноприйняті визначення добротності (електромагнетизм);

дисипативної структури (термодинаміка);

5 біоінертний капіляр (гідрофобний матеріал, що не взаємодіє з біологічним об'єктом).

Теоретичні передумови здійснення способу, що заявляється.

На основі узагальнення наукових даних біофізичних та біохімічних характеристик, що забезпечують функції еритроцитів у механізмі мікроциркуляції крові (Шаплавський М.В. Біоінертизація як біологічна функція Чернівці: Прут, 1996. - 184 с.) були, зокрема, аргументовані

10 такі висновки:

а) фізіологічний поверхневий заряд еритроцита, а з ним і дзета-потенціал формується тільки в аутологічній плазмі, тобто, цільній крові;

б) зміна заряду є наріжною флуктуацією у рівновазі: агрегація -взаємовідштовхування еритроцитів і є фактором швидкості мікроциркуляції;

15 в) основним регулятором заряду у вищезазначених умовах є K^+ , Na^+ АТФ-аза мембрани еритроцитів, через неї здійснюється дія фізіологічних, фармакологічних чи патологічних чинників (останнє доведено експериментом);

г) поза аутологічною плазмою (штучні розчини) заряд еритроцита залежить тільки від їх рН, тобто, залишається постійним і не може нести будь-яку інформацію про його адаптивні

20 флуктуації в організмі, з якого його вилучили, бо система крові є дисипативною структурою. Виконання автоматизованого безелектродного способу визначення заряду еритроцитів здійснюється наступним чином.

В умовах клінічної лабораторії кров (4 мл) брали з ліктьової вени та додавали гепарин (10 Од/мл). Плазму (1 мл) одержували центрифугуванням при 3000 об/хв. протягом 15 хвилин. До комп'ютера підключали вимірювальний комплекс з біоінертним капіляром, де реєструвались параметри добротності (Патент на корисну модель UA 31236. МПК G01N 11/00, G01N 27/00. Пристрій для автоматизованого вимірювання в'язкості біологічних рідин / Шаплавський М.В., Пішак В.П., Слободян О.В., Григоришин П.М., Микитюк О.Ю. : заявник та патентовласник БДМУ. - № 200714803; заявл. 26.12.2007; опубл. 25.03.2008. Бюл. № 6.) і в який вносили клінічні дані

30 вмісту в крові еритроцитів, гематокрит, вміст Na^+ та K^+ . Капсулу з дистиллятом розміщували за стандартною різницею рівнів електролітів $\Delta h = 2,5$ см (див. вищезазначений патент.). Після стабілізації на дисплеї рівня добротності верхню капсулу замінюють на 20 сек. на капсулу з плазмою крові і згодом (див. абсцису графіку - креслення) спостерігають імпульс добротності плазми. Аналогічну маніпуляцію повторюють з кров'ю, плазму якої щойно дослідили. Обидва

35 значення добротності (на кресленні приведена суперпозиція добротності плазми і крові двох досліджень) потрапляють до програми розрахунку заряду еритроцита і на дисплеї поряд з іншими фізичними параметрами крові і плазми з'являються чисельні вирази заряду в Кулонах та ефективних електронів дисоціюючих кислотних груп глікокаліксу еритроцита, що надають йому заряду від'ємного знака.

40 Заряд еритроцита розраховують за виведеною формулою:

$$|e|Z_{\text{ep}} = -[\sigma_{\text{кф}} - (1-k)\sigma_{\text{пл}}]/n_{\text{ep}}\mu^+,$$

де:

$|e|Z_{ep}$ - абсолютний заряд еритроцита в Кулонах;

σ_{kp} - електропровідність крові;

$\sigma_{пл}$ - електропровідність плазми за добротністю;

k - показник гематокриту;

5 n_{ep} - вміст еритроцитів;

μ^+ - рухливість додатних іонів плазми.

Спосіб апробований на кафедрі біологічної фізики та медичної інформатики Буковинського державного медичного університету впродовж 2008, 2009 рр.

Приклад використання способу.

10 Приводяться дані аналізу крові (середній заряд еритроцита) хворої на астму, що одержала лікування за загальноприйнятою схемою:

до лікування $|e|Z_{ep} = -1,97 \cdot 10^{-10}$ Кл; $Z_{ep} = -1,2 \cdot 10^9$;

після лікування $|e|Z_{ep} = -3,19 \cdot 10^{-10}$ Кл; $Z_{ep} = -2,0 \cdot 10^9$.

15 Технічний результат використання способу: автоматизований безелектродний спосіб визначення заряду еритроцита, дозволяє in vitro виявити адаптивні зміни заряду еритроцита за динаміки астми зі сприятливим прогнозом. Враховуючи, що фактори зміни мікроциркуляції крові властиві генезу будь-якого патологічного стану, можна зробити висновок про перспективу широкого впровадження запропонованого способу в практику.

20 ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Автоматизований безелектродний спосіб вимірювання заряду еритроцита, що полягає у вимірюванні фізичних параметрів крові, який **відрізняється** тим, що вимірювання проводять шляхом реєстрації добротності крові та її плазми, при цьому капсули з кров'ю та плазмою розміщують в коливальному контурі, який індуктивно зв'язують з біоінертним тефлоновим капілярним соленоїдом, комплекс вимірювання з'єднують з комп'ютером, в який вводять клінічні дані відносно вмісту досліджуваних крові та її плазми, далі зазначений капілярний соленоїд послідовно заповнюють досліджуваною кров'ю і визначають рівень її добротності та досліджуваною плазмою і також визначають її добротність, а за значеннями добротності досліджуваних крові та її плазми розраховують заряд еритроцита за формулою:

$$|e|Z_{ep} = -[\sigma_{kp} - (1-k)\sigma_{пл}] / n_{ep}\mu^+,$$

де:

$|e|Z_{ep}$ - абсолютний заряд еритроцита в Кулонах;

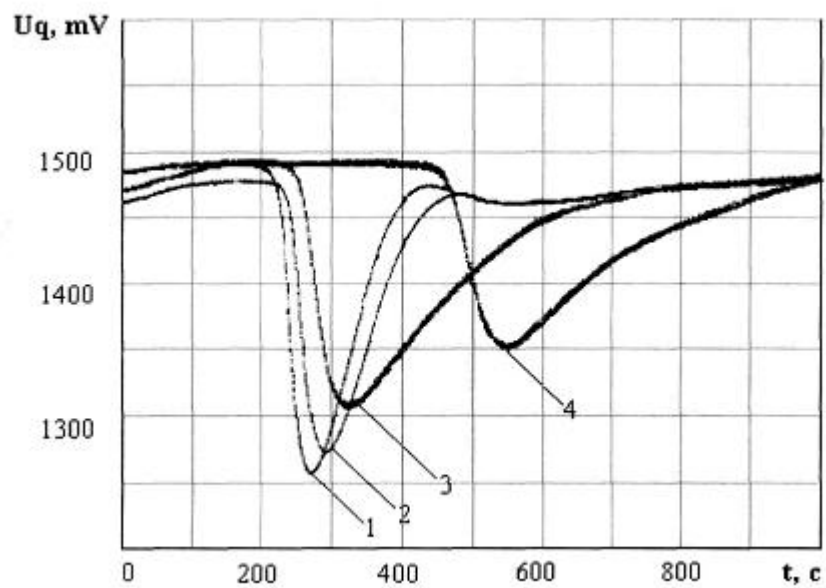
σ_{kp} - електропровідність крові;

35 $\sigma_{пл}$ - електропровідність плазми за добротністю;

k - показник гематокриту;

n_{ep} - вміст еритроцитів;

μ^+ - рухливість додатних іонів плазми.



Комп'ютерна верстка М. Мацело

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

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