(19) **RU** (11) **2 183 327** (13) **C2**

(51) МПК[7] **G 01 N 33/48, 21/71**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 2000111464/28, 27.09.1998

(24) Дата начала действия патента: 27.09.1998

(30) Приоритет: 09.10.1997 US 60/061,464

(46) Дата публикации: 10.06.2002

(56) Ссылки: GE 4421792 A1, 05.01.1995. RU 2031400 C1, 20.03.1995. US 5513642 A, 07.05.1996. US 5590052 A, 31.12.1996.

(85) Дата перевода заявки PCT на национальную фазу: 10.05.2000

(86) Заявка PCT:
IL 98/00466 (27.09.1998)

(87) Публикация PCT:
WO 99/19728 (22.04.1999)

(98) Адрес для переписки:
129010, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3, ООО "Юридическая фирма Городисский и Партнеры", Е.И.Емельянову

(71) Заявитель:
ЛУМИТЕСТ ЛТД. (IL)

(72) Изобретатель: ШНИЦЕР Сергей (IL), РЕЗНИК Абрахам (IL), ЛАНИР Амос (IL), ПЬЮК Владимир (IL)

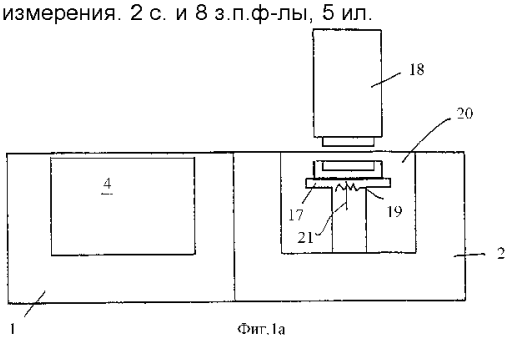
(73) Патентообладатель:
ЛУМИТЕСТ ЛТД. (IL)

(74) Патентный поверенный:
Емельянов Евгений Иванович

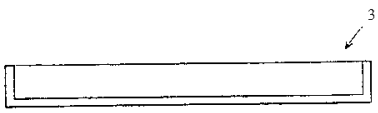
(54) СПОСОБ И УСТРОЙСТВО ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ ПЕРОКСИДАЦИИ ЛИПИДОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ И СУСПЕНЗИЯХ ТКАНЕЙ

(57)

Изобретение относится к способу и устройству для измерения степени пероксидации липидов в биологических жидкостях и суспензиях тканей, в котором специально подготовленные пробы, содержащие липиды, подвергают нагреву для того, чтобы вызвать термохемилюминесцентное свечение, испускаемое пробой и усиливаемое до такой степени, что его можно обнаружить с помощью фотодетектора 18 специального назначения. Измерение света позволяет сделать заключение о содержании пероксидов и в последующем получить точную оценку пероксидации липида. Технический результат - обеспечение простого и чувствительного способа измерения. 2 с. и 8 з.п.ф-лы, 5 ил.



Фиг.1а



Фиг.1б

RU 2183327 C2

RU 2183327 C2

(19) **RU** (11) **2 183 327** (13) **C2**

(51) Int. Cl.[7] **G 01 N 33/48, 21/71**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: 2000111464/28, 27.09.1998

(24) Effective date for property rights: 27.09.1998

(30) Priority: 09.10.1997 US 60/061,464

(46) Date of publication: 10.06.2002

(85) Commencement of national phase: 10.05.2000

(86) PCT application:
IL 98/00466 (27.09.1998)

(87) PCT publication:
WO 99/19728 (22.04.1999)

(98) Mail address:
129010, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str.3,
OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery", E.I.Emel'janovu

(71) Applicant:
LUMITEST LTD. (IL)

(72) Inventor: ShNITsER Sergej (IL),
REZNIK Abrakham (IL), LANIR Amos (IL), P'JuK Vladimir (IL)

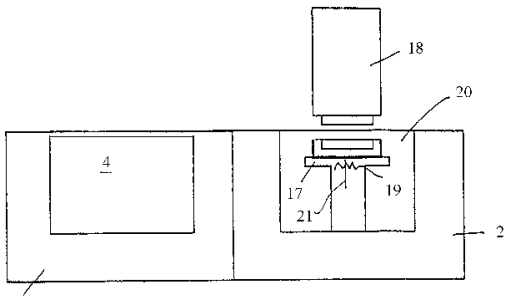
(73) Proprietor:
LUMITEST LTD. (IL)

(74) Representative:
Emel'janov Evgenij Ivanovich

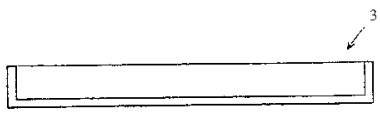
(54) METHOD AND DEVICE TO MEASURE LIPID PEROXIDATION IN BIOLOGICAL LIQUIDS AND TISSUE SUSPENSIONS

(57) Abstract:

FIELD: medicine. SUBSTANCE: specially prepared lipid-containing samples are subjected for heating to obtain thermochemiluminescence lighting emitted by a sample and enhanced to the degree to be seen with the help of a photodetector (18) of special purpose. Light measurement enables to conclude on the content of peroxides and, then, obtain accurate evaluation of lipid peroxidation. EFFECT: more simplified and sensitive method to measure lipid peroxidation. 10 cl, 5 dwg



Фиг.1а



Фиг.1б

RU 2183327 C2

RU 2183327 C2

Область техники

Настоящее изобретение относится к способам и устройствам для оценки степени пероксидации липидов в биологических жидкостях и, в частности, жидкостях человека. Однако следует понимать, что настоящее изобретение могут применять также для измерения пероксидации липидов других соединений, содержащих липиды.

Предшествующий уровень техники

Кислород необходим для многих метаболических реакций поддержания жизни. Воздействуя на ненасыщенные жирные кислоты, активные формы кислорода (свободные радикалы), вообще говоря, производят пероксиды липидов. Оксидацию ненасыщенных жирных кислот получают путем введения молекул кислорода в двойные связи. Во время реакции двойные связи цис-типа преобразуются в сопряженные двойные связи, производя таким образом гидроперекисной тип пероксида липида с сопряженными двойными связями.

Когда молекулы кислорода непосредственно вводят в насыщенные или ненасыщенные жирные кислоты в реакции фотосенсибилизированного окисления, образуются гидропероксиды липидов с- или без сопряженных двойных связей. В реакциях разложения и полимеризации гидроксидов липидов в качестве первичных продуктов окисления производят вторичные оксиды различных типов.

Кислород и его активированные промежуточные продукты могут вступать в реакции с компонентами клеток, что приводит к деградации или инактивации молекул.

Набор внутриклеточных или внеклеточных условий, который делает возможным химическое или метаболическое образование реактивных разновидностей кислорода, таких как супероксидные радикалы, перекись водорода, пероксиды липидов или родственные формы, называют оксидативным стрессом. Обычно метаболическая деятельность клетки способна контролировать или предотвращать негативные воздействия оксидативного стресса. Восприимчивость к оксидативному стрессу является функцией общего баланса между факторами, вызывающими оксидативный стресс, и теми факторами, которые проявляют антиоксидантные способности.

Вызванное свободными радикалами пероксидативное разрушение липидов мембран долго считали критическим инициирующим событием, ведущим к поражению клетки. В присутствии свободного радикала или инициатора свободных радикалов биологические вещества и, особенно, клеточные мембраны, которые содержат относительно большую долю полиненасыщенных липидов, становятся восприимчивыми к окислению.

Процесс пероксидации липидов, таким образом, ассоциирован с потерей мембраной полиненасыщенных жирных кислот и формированием гидроксидов, промежуточных соединений свободных радикалов и других вторичных продуктов. Пероксидация важнейших жирных кислот может нарушить тонкую структуру биологических мембран и способна, таким образом, негативно воздействовать на проницаемость и функции мембраны. Процесс пероксидации липидов, если его не прервать, может привести к разрыву клеточных мембран и высвобождению продуктов распада. В результате эти процессы могут вызвать необратимые повреждения клеток и породить и/или усилить патогенез при определенных условиях поражения или болезни.

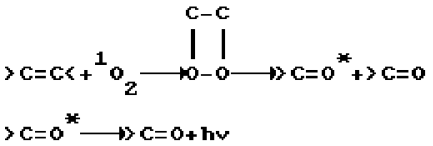
Предотвращение потенциально негативного воздействия кислорода и его реактивных промежуточных продуктов достигают с помощью различных систем антиоксидантной защиты, уже представленных в клетке, или путем их усиления извне с помощью различных форм искусственных антиоксидантов.

Следовательно, обеспечение простого, чувствительного и надежного способа изменения степени пероксидации липидов в биологических и, особенно, человеческих жидкостях и тканях может составить важное средство для изучения различных патологий и болезней, например дисбаланс питания, наследственные заболевания, сердечно-сосудистые заболевания, рак, диабет, синдром острой респираторной недостаточности и др.

Разложение пероксидов высвобождает энергию в форме хемилюминесценции. Установлено, что имеется корреляция между интенсивностью хемилюминесценции и скоростью разложения перекиси водорода. Хемилюминесценцию можно вызвать нагревом с помощью процесса термохемилюминесценции (сокращенно ТХЛ).

Явление ТХЛ в основном вызвано двумя типами основных реакций:

I. Температурное разложение диоксатан-циклических пероксидов, как показано ниже:





II. Окисление радикала липида во время нагревания;

$R+O_2 \rightarrow ROO^{\circ}$

$2ROO^{\circ} \rightarrow {}^1O_2+2C=O+h\nu$

где

$^1O_2$ - синглет кислорода

C=O* - нестабильное карбониловое соединение

ROO° - перокси радикал липида.

Оба типа реакций проявляют способность липидных веществ, которые могут присутствовать в биологических жидкостях и тканях, реагировать через цепную реакцию окисления свободного радикала с образованием нестабильных карбониловых продуктов.

Низкоинтенсивную хемилюминесценцию, вызванную нестабильностью карбониловых фрагментов различного происхождения, могут обнаруживать как видимый свет в диапазоне 400-600 нм. Большинство обычных методов измерения степени пероксидации липидов, например популярный тест пероксидации липидов TBA-RS, не основаны на хемилюминесценции. По способу, описанному в патенте США 4900680 (автор Миядзава и др.), пробу, содержащую липиды, подвергают липидной хроматографии для разделения липидов на липидные классы, впоследствии

RU 2183327 C2

RU 2183327 C2

приводят их в соприкосновение с люминесцентными реактивами, что приводит к генерации светового излучения в количестве, соответствующем содержанию гидропероксида липида.

Способом, наиболее близким из известных к описываемому в данном изобретении, является способ и устройство для измерения люминесценции биологических жидкостей, описанные в выложенной заявке ФРГ 4421792 (авт. Шницер и др.) и включенные сюда в качестве ссылки. В этом документе описан способ подготовки пробы биологической жидкости, включающий нагревание пробы в условиях вакуума при температуре, которая находится в диапазоне от точки замерзания пробы до температуры, достаточной для возбуждения люминесценции, излучаемой исследуемой жидкостью.

К сожалению, известный способ не позволяет измерить интенсивность люминесценции надежным образом и получить стабильную корреляцию между интенсивностью ТХЛ и временем. Причина этого кроется в том факте, что структура замороженной пробы не является непрерывной и содержит пустоты, связанные с эвакуацией жидкой фазы. Другой причиной является относительно медленный нагрев пробы, что не оставляет достаточно времени для измерения ТХЛ.

Таким образом, можно заключить, что проблема надежного измерения степени ТХЛ пока не решена.

Раскрытие изобретения

Основной задачей настоящего изобретения является предложение способа и устройства для измерения ТХЛ, в которых вышеупомянутые ограничения существенно снижены или преодолены.

В частности, основной задачей настоящего изобретения является предложение нового улучшенного способа и устройства для измерения степени пероксидации липидов, позволяющих надежно измерять ТХЛ и устанавливать стабильную корреляцию между интенсивностью ТХЛ и временем.

Указанные выше, а также прочие задачи и преимущества настоящего изобретения можно достичь в соответствии с нижеследующей комбинацией его важнейших признаков, описываемых с помощью различных вариантов реализации изобретения.

В варианте реализации настоящего изобретения, который относится к способу измерения пероксидации липидов в биологических жидкостях, суспензиях биологических тканей или т.п., в котором пробы указанной жидкости или суспензии нагревают так, чтобы возбудить в ней термохимическую люминесценцию (ТХЛ), и количество упомянутой ТХЛ можно было измерить, упомянутый способ включает такую последовательность операций:

а) помещение пробы указанной жидкости или суспензии в резервуар, имеющий в основном плоское дно,

б) размещение резервуара в камеру испарения и установка его на основание, выполненное в основном из металлического материала,

в) сообщение резервуару возвратно-поступательных движений с целью распределить пробу по дну резервуара в основном гомогенным образом,

г) выгонку пробы, находящейся внутри камеры, при сниженном давлении в течение периода времени, достаточного для удаления жидкой фазы из пробы и формирования на дне резервуара в основном непрерывной пленки, состоящей из сухого твердого остатка,

д) перенос резервуара с остатком в камеру обработки и размещение его на пластине, температура которой достаточна для возбуждения ТХЛ и ее излучения указанным остатком,

е) восприятие указанной ТХЛ и измерение ее интенсивности, например, оптическим фотодетектором в течение времени, достаточного для установления стабильной корреляции между интенсивностью ТХЛ и временем.

В соответствии с одним из предпочтительных вариантов реализации изобретения, относящимся к способу, резервуар изготавливают из тонкой металлической фольги в виде сосуда однократного применения, а подставку изготавливают из алюминия.

В соответствии с одним из предпочтительных вариантов реализации изобретения, пробе сообщают возвратно-поступательное движение, по меньшей мере, в течение 40 секунд, так чтобы распределить пробу по дну указанного резервуара слоем толщиной 0,3-0,5 мм.

В соответствии с одним из предпочтительных вариантов реализации изобретения, операцию испарения проводят при пониженном давлении, не превышающем 2 мбар, в течение периода времени не более 10 минут.

В соответствии с одним из предпочтительных вариантов реализации изобретения, до размещения резервуара на пластине ее нагревают до температуры, по меньшей мере, 60°С.

В соответствии с одним из предпочтительных вариантов реализации изобретения, относящимся к способу, интенсивность ТХЛ измеряют в диапазоне 400-600 нм в течение, по меньшей мере, 300 секунд.

В соответствии с первым предпочтительным вариантом реализации изобретения, относящимся к устройству для измерения пероксидации липидов в биологических жидкостях, суспензиях биологических тканей или т.п., в котором пробу жидкости или суспензии нагревают до возбуждения в ней термохимической люминесценции (ТХЛ), и в которой количество ТХЛ можно измерить, причем устройство содержит:

а) камеру выгонки, снабженную средствами для гомогенного распределения пробы в резервуаре и средствами выгонки, способными удалить жидкую фазу из пробы так, чтобы образовалась тонкая, в целом непрерывная пленка, состоящая из твердого сухого остатка, причем средства для гомогенного распределения включают в себя основание, выполненное предпочтительно из металлического материала, причем основание снабжено выемкой для установки в нее резервуара, а также снабжено средствами приведения в движение для

RU 2183327 C2

RU 2183327 C2

придания возвратно-поступательных движений основанию,

б) камеру нагревания, снабженную пластиной для размещения на ней резервуара, со средствами нагрева для нагревания пластины, а также со средствами для обнаружения и измерения ТХЛ,

в) блок записи данных для визуального представления результатов измерения ТХЛ,

г) блок управления и обработки данных для управления средствами для гомогенного распределения, средствами для приведения в движение, средствами выгонки, средствами нагрева, средствами для обнаружения и измерения ТХЛ и блоком записи данных.

В соответствии с одним из предпочтительных вариантов реализации устройства, средства выгонки включают в себя вакуум-насос, способный вырабатывать пониженное давление в камере выгонки.

В соответствии с еще одним из предпочтительных вариантов реализации изобретения, основание изготовлено в виде диска из алюминия, причем диск установлен на эластичные трубчатые элементы, соединяющие этот диск с основанием камеры выгонки, а средства приведения в движение включают двигатель, сообщающий возвратно-поступательные движения пластине через кулачковый механизм.

В соответствии с еще одним из предпочтительных вариантов реализации устройства, средства нагрева включают в себя транзистор и датчик температуры, а средства для обнаружения и измерения ТХЛ включают в себя электронный умножитель.

Настоящее изобретение в составе предпочтительных вариантов его реализации было лишь кратко изложено выше. Для лучшего понимания настоящего изобретения и его преимуществ следует обратиться к нижеследующему описанию вариантов его реализации.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1а и 1б схематично изображают устройство для измерения степени пероксидации липидов в соответствии с настоящим изобретением и резервуар для размещения пробы биологической жидкости.

Фиг. 2а, 2б изображают соответственно продольный разрез и вид сверху с частичным разрезом камеры выгонки.

Фиг. 3 - это блок-схема способа измерения степени пероксидации липидов в соответствии с настоящим изобретением.

Фиг. 4 - график корреляции между интенсивностью ТХЛ и временем, полученный способами предыдущего уровня техники.

Фиг. 5а и 5б изображают две кривые, выражающие корреляцию между интенсивностью ТХЛ и временем, установленные по методу, соответствующему настоящему изобретению.

Подробное описание предпочтительных вариантов реализации изобретении

На фиг.1а изображено устройство для измерения ТХЛ в соответствии с настоящим изобретением, которое включает в себя блок 1 подготовки пробы и измерительный блок 2. Как показано на фиг.1б, небольшое количество, обычно 150 мл, пробы биологической жидкости, подлежащей испытанию на степень пероксидации липидов, помещают в резервуар 3, предпочтительно изготовленный в форме кюветы однократного применения, дно которой преимущественно плоское диаметром 5 см.

Вышеописанную кювету, которая содержит жидкую пробу, помещают в блок подготовки пробы, изготовленный в виде цилиндрической камеры 4 выгонки, которую с помощью кольцевого уплотнения 5 можно плотно закрывать крышкой (не показана) так, чтобы герметично изолировать содержимое камеры от окружающей среды.

Внутри камеры имеется двигатель 6, жестко установленный на основании камеры с помощью кронштейна 6'. Энергию на двигатель подают по электрическим проводам, проходящим через отверстие 7 в основании камеры. На оси 8 двигателя устанавливают кулачок 9, жестко прикрепленный к ней с помощью фиксирующего винта 9'. На опорных элементах 10 находится преимущественно плоская пластина 11, на верхней стороне которой имеется углубление 12 для установки туда резервуара 3. Нижняя сторона пластины снабжена круглым отверстием 13, диаметр которого выбирают таким образом, чтобы туда помещался кулачок, вызывая тем самым возвратно-поступательные движения пластины при вращении двигателем кулачка.

Опорные элементы 10 выполняются в форме тонких трубок из эластичного материала, чтобы обеспечить плавность хода возвратно-поступательного движения пластины, приводимой в движение кулачком. Резервуар с пробой биологической жидкости помещают в углубление 12 пластины и включают двигатель, чтобы придать возвратно-поступательное движение пластине, тем самым встряхивая пробу. Частоту и длительность встряхивания выбирают такими, чтобы получить в целом равномерное распределение слоя жидкости по дну резервуара. На практике встряхивание производят в течение 40-60 секунд, чтобы получить после встряхивания слой пробы толщиной 0,3-0,5 мм. Указанная экспериментально установленная толщина слоя жидкости пробы очень важна для избежания нежелательного образования пузырьков в жидкости пробы и их воздействия на операцию сушки (выгонкой), которую производят после встряхивания и которая подробнее описана ниже.

Если операцию встряхивания провели правильно, то после следующей операции выгонки можно получить сухой остаток (сублимат) в виде тонкой непрерывной пленки, равномерно распределенной по дну резервуара.

Процесс сушки (выгонки) проводят внутри камеры выгонки при пониженном давлении, которое создают и поддерживают с помощью вакуум-насоса (не показан), связанного с внутренним объемом камеры через патрубок 14. Кроме того, предусматривают подходящие средства, чувствительные к вакууму, подсоединенные к внутреннему объему камеры через патрубок 15, предназначенные для измерения давления внутри камеры выгонки. Эмпирически обнаружили, что необходим баланс между разумной длительностью процесса сушки, необходимой для установления пониженного давления, и желаемыми свойствами высушенного остатка, позволяющими достоверно измерить ТХЛ. Эти свойства включают количество сухого

RU 2183327 C2

RU 2183327 C2

вещества в тонкой пленке остатка, которое должно быть не менее 99,9% и отсутствие пустот, связанных с наличием пузырьков в жидкости во время выгонки.

Эмпирически обнаружили, что наилучшие результаты в смысле продолжительности процесса сушки и достижения свойств высушенной пробы, позволяющих получить наиболее достоверное измерение ТХЛ получают, если камеру вакуумируют в течение 1-3 минут, чтобы снизить давление до величины не более 2 мбар, а если такое давление выдерживают, по меньшей мере, 6-8 минут. С этой целью может с успехом применяться механический насос со скоростью откачивания 20 л/мин и предельным давлением $1 \cdot 110^{-3}$ Торр. Чтобы избежать замерзания высушенной пробы в результате высокой скорости сушки пластину 11 изготавливают из материала с высокой теплопроводностью, например из металла. Очень желательно, чтобы при размещении резервуара с пробой в углубление 12 пластины устанавливался тепловой контакт между ними, и благодаря высокой теплопроводности пластины предотвращалось замерзание пробы при сушке. На практике, желательно изготавливать пластину из алюминия, который сочетает высокую теплопроводность с возможностью легкой обработки. Однако могут применяться и другие металлы и неметаллические материалы, при условии, что их теплопроводность, легкость обработки и стоимость сопоставимы с этими качествами алюминия.

После завершения процесса сушки вакуумный насос выключают, и камеру соединяют с атмосферой через патрубок 16, чтобы вернуть давление в камере к нормальному значению.

Крышку открывают и переносят резервуар с высушенной пробой из блока 1 подготовки пробы в камеру 20 обработки измерительного блока 2, в которой измеряют ТХЛ.

Камеру обработки снабжают пластиной 17 для размещения резервуара с замороженной пробой под средствами фотодетектирования 18, снабженной средствами нагрева 19 для нагревания пластины и средствами измерения 21 для измерения температуры пластины.

В отличие от способов, известных из уровня техники, в которых замороженную пробу на пластине нагревают вместе с ней для возбуждения ТХЛ, в настоящем изобретении пробу помещают на уже нагретую пластину, которая заранее прогрета до заданной температуры, до установки на нее резервуара.

Установлено, что применение мощного транзистора в качестве средства нагрева имеет большие преимущества. Температурой транзистора управляют с помощью датчика температуры, закрепленного рядом с корпусом транзистора. Благодаря малому времени отклика транзистора поддерживают стабильный температурный режим, что является критически важным для точных измерений люминесценции. На практике подставку нагревают до приблизительно 60 °С до того, как в камеру обработки вносят резервуар и устанавливают его на пластину.

Анализ пробы проводят с помощью средств фотодетектирования 18, например обычного фотоумножителя, способного измерить интенсивность ТХЛ в видимом диапазоне 300-650 нм.

До и после измерения ТХЛ-излучения пробы измеряют калибровочный сигнал, вырабатываемый высокочастотным диодом от сигнала стандартного генератора 22, и умножают его с помощью усилителя 23.

Выходной сигнал с анода умножителя усиливают и подают в компьютер, который выступает в роли терминала для сбора информации, записывая одновременно время и интенсивность излучаемого люминесцентного света. Полученную кривую ТХЛ математически обрабатывают, причем двумя основными параметрами для обработки являются: 1) амплитуда ТХЛ и 2) наклон кривой ТХЛ, измеренный в интервале между 120 и 140 секундами после установки резервуара с пробой на нагретую пластину. Измерение прекращают после указанного интервала времени. Расчеты и математическую обработку результатов анализа проводят общеизвестными методами обработки сигналов в блоке 24 управления и обработки информации.

Результаты измерения интенсивности ТХЛ относительно времени отображают на экране компьютера и/или на принтере блока 25 записи данных. Блок 26 питания служит для подачи электрической энергии, необходимой для работы устройства.

Ниже показано на не ограничивающих примерах и фиг. 4-5а, б, как можно проводить измерение ТХЛ в соответствии с настоящим изобретением, и как можно с успехом использовать на практике результаты этих измерений, по сравнению со способами, известными в уровне техники.

На фиг. 4 показана типичная зависимость интенсивности ТХЛ от времени, измеренная в соответствии со способом, известным из уровня техники, согласно которому высушенный образец нагревают одновременно с пластиной. Легко можно понять, что такая зависимость немонотонна и состоит из двух участков. Первый, возрастающий участок связан с нагревом пробы и соответствует возбуждению люминесценции. Второй участок связан с более или менее установившимся количеством люминесценции, излучаемым пробой. По форме этого участка кривой трудно сделать заключение о скорости люминесценции, т.к. видно, что интенсивность ТХЛ незначительно изменяется во времени и, следовательно, невозможно недвусмысленно предсказать тенденцию этой зависимости.

На примере 1 ниже описано как измерение ТХЛ в соответствии с настоящим изобретением используется для измерения степени пероксидации липидов для пациентов с синдромом острой респираторной недостаточности.

Пример 1.

Испытано 12 проб бронхоальвеолярной мокроты (БАМ), взятых от пациентов, страдающих синдромом острой респираторной недостаточности (СОРН).

Все пациенты страдали серьезной дисфункцией легких, соответствовавшей степени поражения легких более 2, 5, и находились на искусственной вентиляции положительным давлением. Контрольная группа состояла из 6 пациентов с нормальной

RU 2183327 C2

RU 2183327 C2

дыхательной активностью. Пациентов доставили в послеоперационный блок после обширных операций на грудине и экстубировали через 2-4 часа. Анализ ТХЛ произвели до экстубации.

Кювету со 150 микролитрами БАМ внесли в камеру выгонки устройства, поставили на пластину и горизонтально покачивали в течение около 40 секунд для того, чтобы гомогенно распределить пробу по дну кюветы. Затем камеру вакуумировали так, что давление в ней понизилось до 2 мбар. Такое давление выдерживали в течение 6-8 минут до тех пор, пока на дне кюветы не образовалась достаточно тонкая непрерывная пленка сухого остатка БАМ толщиной 0,3 мм. Кювету перенесли в камеру измерения и поставили на нагревающую пластину, предварительно нагретую до 80°С.

Измерение ТХЛ производили имеющимся в продаже фотоумножителем. Результаты измерений показаны на фиг.5а, б.

ТХЛ БАМ пациентов из контрольной группы (фиг.5а) характеризовалась ниспадающей интенсивностью ТХЛ, определяемой отрицательным наклоном. Кинетическая кривая ТХЛ пациентов, страдающих СОРН, (фиг.5б) характеризовалась немедленным увеличением интенсивности ТХЛ, определяемым сильно положительным наклоном. Было обнаружено лавинообразное увеличение интенсивности ТХЛ, связанное с состоянием высокой пероксидации липидов (LPx) в БАМ пациентов, страдающих СОРН.

Вышеописанный способ измерения ТХЛ и устройство для его реализации очень полезны на практике для измерения активно-реактивных карбонилов - продуктов LPx. Информацию получают быстро, с короткой процедурой подготовки пробы, и полученная информация обеспечивает достоверное предсказание интенсивности ТХЛ в функции времени, и, таким образом, обеспечивает более надежную диагностику возможных причин, связанных с LPx.

Настоящее изобретение можно применять в различных областях, где требуется оценка LPx, которая производится путем измерения ТХЛ, например, определение специфических заболеваний, вызванных дисбалансом питания, воздействием окружающей среды, наследственных заболеваний, рака, повреждения печени, диабета, почечной недостаточности, бесплодия, для определения активности новых форм антиоксидантов, установления устойчивости новых лекарственных веществ к окислению.

Формула изобретения:

1. Способ измерения пероксидации липидов в биологических жидкостях, суспензиях биологических тканей и т. п. , при котором пробу жидкости или суспензии нагревают для возбуждения в ней термохимической люминесценции (ТХЛ), причем количество ТХЛ может быть измерено, при этом способ включает в себя следующую последовательность операций: а) помещение пробы жидкости или суспензии в резервуар, имеющий в основном плоское дно, б) размещение резервуара в камере выгонки и установки его на основание, выполненное в основном из металла, в) сообщение возвратно-поступательных движений резервуару с целью распределить пробу по дну резервуара в основном гомогенным образом, г) выгонку пробы, находящейся в камере, при сниженном давлении в течение времени, достаточного для удаления жидкой фазы из пробы и образования на дне резервуара в основном непрерывной пленки, состоящей из сухого твердого остатка, д) перенос резервуара с остатком в камеру обработки и размещение его на пластине, температура которой достаточна для возбуждения ТХЛ и ее излучения остатком, е) обнаружение ТХЛ и измерение ее интенсивности, например, оптическим фотодетектором в течение времени, достаточного для установления стабильной корреляции между интенсивностью ТХЛ и временем.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что резервуар изготавливают в виде сосуда однократного применения, выполненного из тонкой металлической фольги, а пластину изготавливают из алюминия.

3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что возвратно-поступательное движение сообщают пробе в течение, по меньшей мере, 40 с так, чтобы распределить пробу по дну резервуара тонким, в основном непрерывным слоем.

4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что операцию выгонки проводят при пониженном давлении, не превосходящем 2 мбар, в течение времени не более 10 мин.

5. Способ по п. 1, отличающийся тем, что перед переносом резервуара в камеру обработки пластину нагревают до температуры, по меньшей мере, 60°С.

6. Способ по п. 1, отличающийся тем, что интенсивность ТХЛ измеряют в диапазоне 400-600 нм в течение, по меньшей мере, 300 с.

7. Устройство для измерения пероксидации липидов в биологических жидкостях, суспензиях биологических тканей или т. п. , в котором проба жидкости или суспензии нагревается, чтобы возбудить в ней термохимическую люминесценцию (ТХЛ), причем количество ТХЛ можно измерить, при этом устройство содержит: а) камеру выгонки, снабженную средствами для гомогенного распределения пробы в резервуаре и средствами выгонки, способными удалить жидкую фазу из пробы так, чтобы образовать тонкую, в основном непрерывную пленку, состоящую из сухого твердого остатка, причем средства для равномерного распределения включают в себя основание, выполненное предпочтительно из металла, при этом основание снабжено углублением для установки в него резервуара, а также предусмотрены средства приведения в движение для сообщения возвратно-поступательного движения основанию, б) камеру нагревания, снабженную пластиной для размещения на ней резервуара, со средствами нагрева для нагревания пластины и со средствами обнаружения и измерения ТХЛ, в) блок записи данных для представления в визуальной форме результатов измерения ТХЛ, г) блок управления и обработки данных для управления средствами для гомогенного распределения, средствами приведения в движение, средствами выгонки, средствами нагрева средствами обнаружения и измерения ТХЛ и блоком записи данных.

RU 2183327 C2

RU 2183327 C2

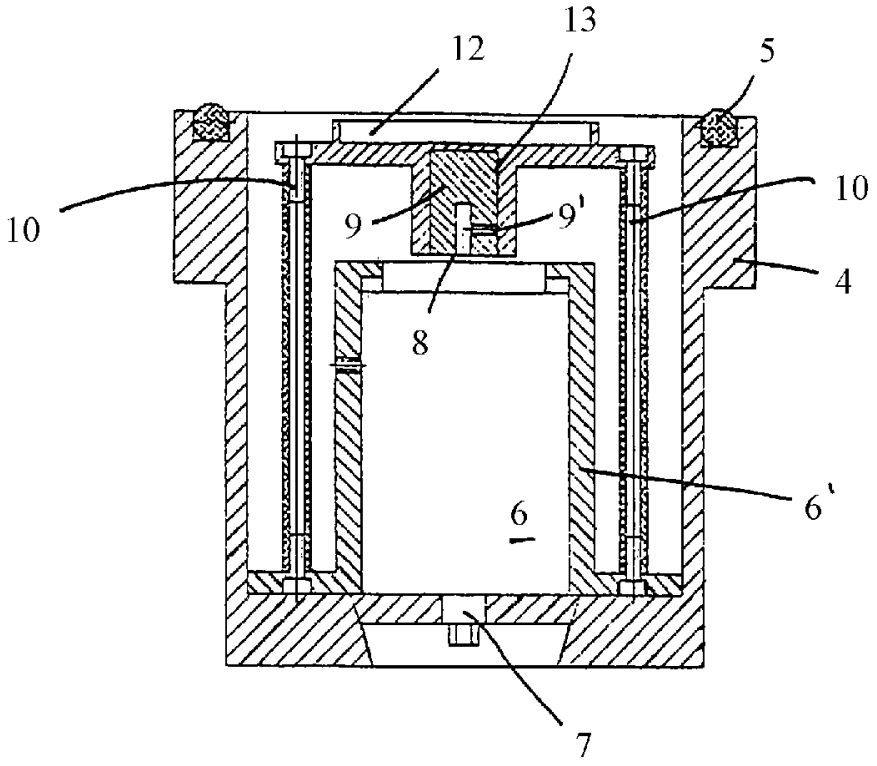
8. Устройство по п. 7, отличающееся тем, что средства выгонки включают в себя вакуумный насос, способный создавать пониженное давление внутри камеры выгонки.

9. Устройство по п. 7, отличающееся тем, что основание изготовлено в форме диска, выполненного из алюминия, а диск установлен на эластичные трубчатые элементы, которые соединяют диск с основанием камеры выгонки, причем средства приведения в движение содержат двигатель, сообщающий возвратно-поступательные движения пластине через кулачковый механизм.

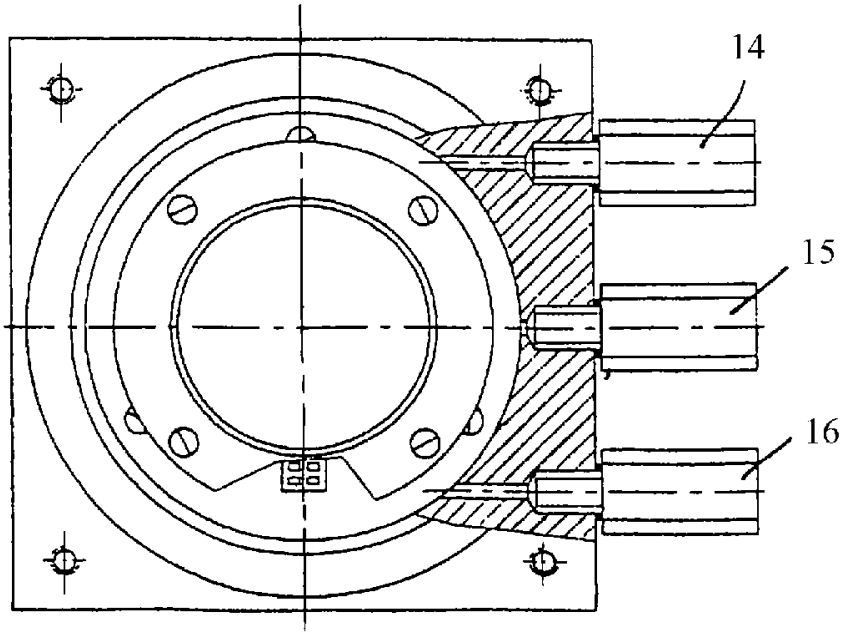
10. Устройство по п. 7, отличающееся тем, что средства нагрева содержат транзистор и датчик температуры, а средства для обнаружения и измерения ТХЛ содержат фотоэлектронный умножитель.

RU 2183327 C2

RU 2183327 C2



Фиг.2а

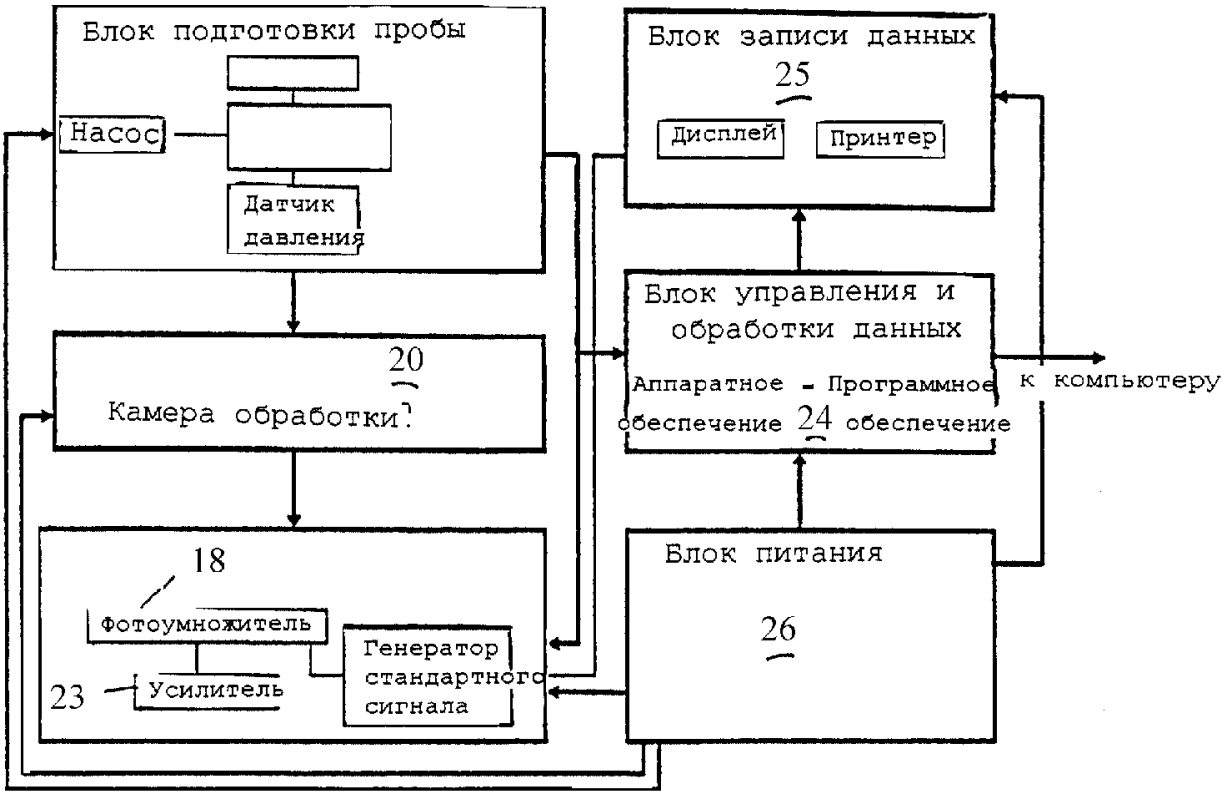


Фиг.2б

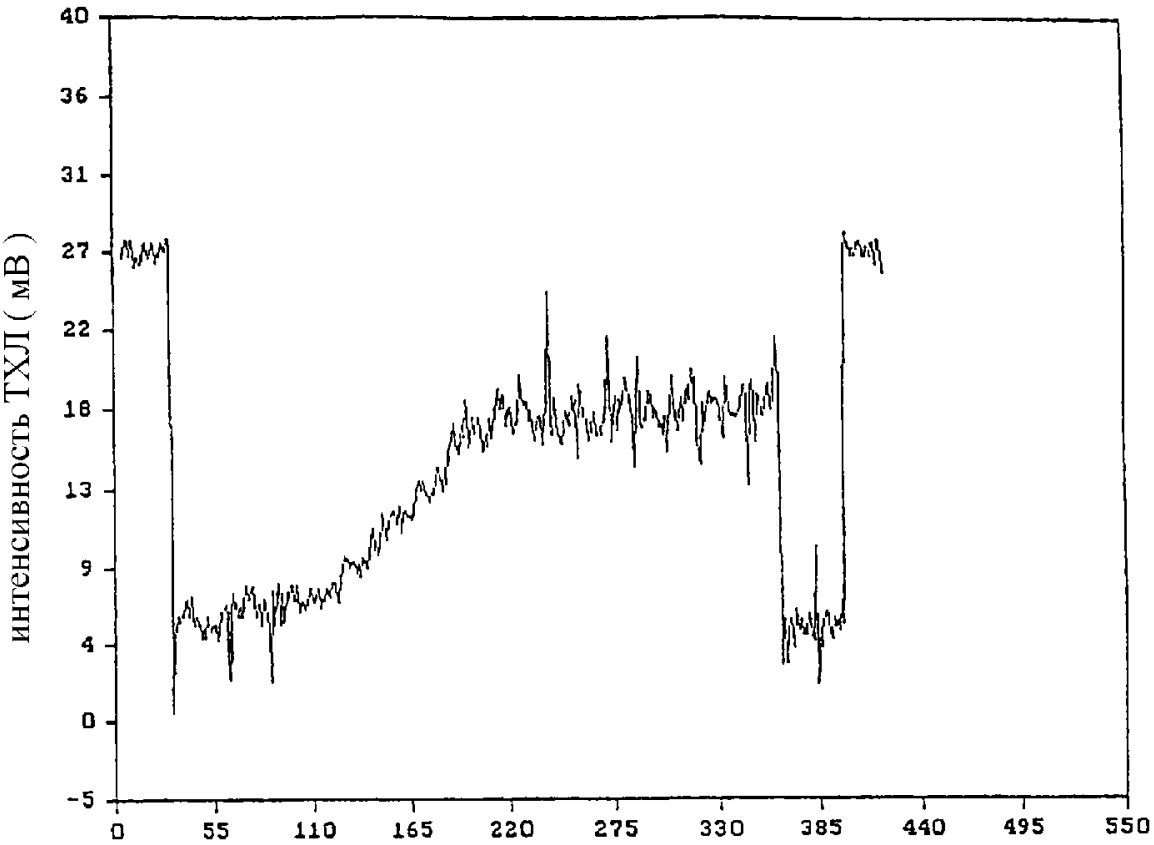
RU 2183327 C2

RU 2183327 C2

Устройство для измерения ТХЛ



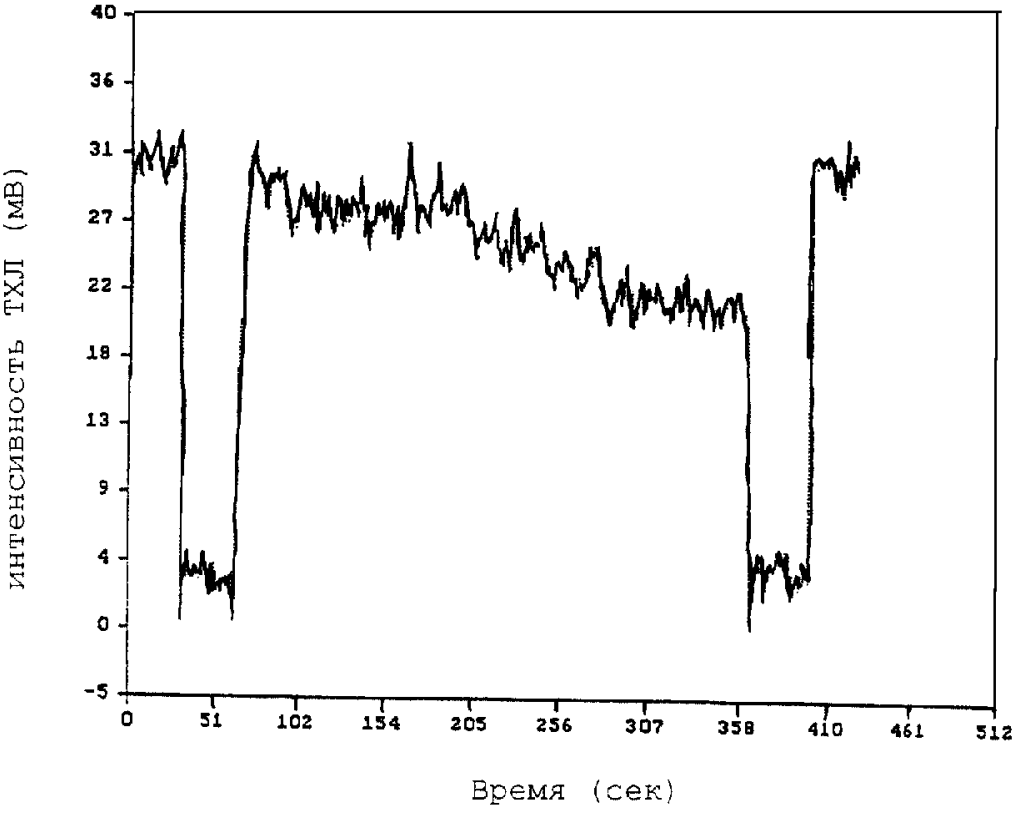
Фиг.3



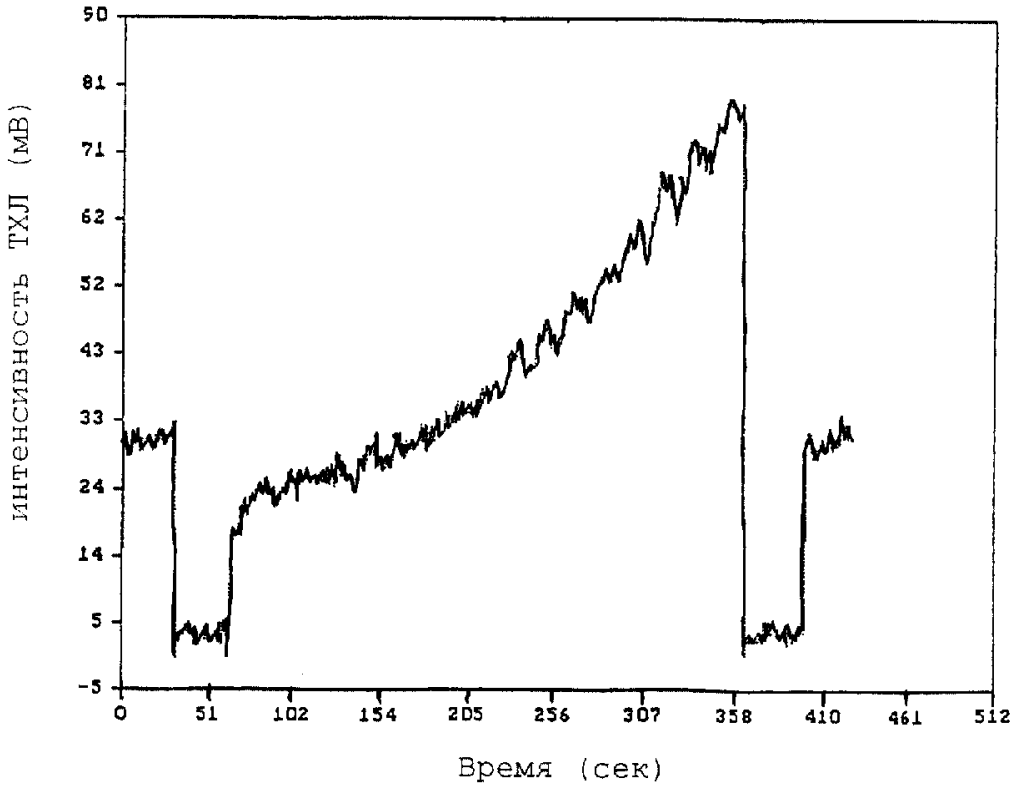
Фиг.4

RU 2183327 C2

RU 2183327 C2



Фиг.5а



Фиг.5б

RU 2183327 C2