



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2005141251/15, 28.12.2005

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
28.12.2005

(43) Дата публикации заявки: 10.07.2007

(45) Опубликовано: 10.11.2007 Бюл. № 31

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: SU 1422158 A1, 07.09.1988. КАН Е.Л. Исследование гемодинамики и активности симпатико-адреналовой системы у авиадиспетчеров во время их профессиональной деятельности. - Авиакосмическая и экологическая медицина, 1992, т.26, №1, с.41-43. САРАЕВА М.Э. и др. Методика определения активности симпатико-адреналовой системы в динамике. Курский гос. мед. ин-т, (см. прод.)

Адрес для переписки:

167982, Республика Коми, г.Сыктывкар, ул.
Коммунистическая, 28, Институт биологии Коми
НЦ УрО РАН, пат. пов. Л.Б. Печерской

(72) Автор(ы):

Петрова Наталья Борисовна (RU),
Мойсеенко Нелли Алексеевна (RU),
Володин Владимир Витальевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Институт биологии Коми научного центра
Уральского отделения Российской академии
наук (RU)

(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ СИМПАТО-АДРЕНАЛОВОЙ СИСТЕМЫ

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к экологической физиологии и эндокринологии. Для определения функциональной активности симпатико-адреналовой системы (САС) животных и человека исследуют кровь. Осуществляют приготовление трех проб крови, разведенных в 200 раз, причем первой - с изотоническим раствором хлорида натрия, второй контрольной - с раствором фитогемагглютининов, третьей опытной - с раствором фитогемагглютининов и пропранолола. Инкубируют пробы в течение 10 минут.

Подсчитывают под микроскопом в камере Горяева количество свободных неагглютинировавших эритроцитов. Вычисляют показатель активности (АК) по формуле:

$$AK = \frac{\text{Эр} - \text{ПП}}{\text{Эр} - \text{Контр}} \times 100\%,$$

где Эр - количество эритроцитов в 0,85% растворе NaCl; Контр. - количество эритроцитов в растворе ФГА; ПП - количество эритроцитов в растворе ФГА и пропранолола. При АК ниже 80% считают САС неактивной. Использование способа позволяет повысить точность оценки САС.

(56) (продолжение):

1989. HOLLNBACH E. et al. Rapid and sensitive determination of catecholamines and the metabolite 3-methoxy-4-hydroxyphen-ethyleneglycol using HPLC following novel extraction procedures. Life Sci. 1998, 63(9), p.737-750, PMID: 9740311, реф., [он-лайн], [найдено 01.09.2006], найдено из базы данных PubMed. EISENHOFER G. et al. Plasma metadrenalines: do they provide useful information about sympatho-adrenal function and catecholamine metabolism? Clin Sci (Lond). 1995, 88(5), p.533-542, PMID: 7614812, реф., [он-лайн], [найдено 01.09.2006], найдено из базы данных PubMed.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2005141251/15, 28.12.2005**(24) Effective date for property rights: **28.12.2005**(43) Application published: **10.07.2007**(45) Date of publication: **10.11.2007 Bull. 31**

Mail address:

**167982, Ruspublika Komi, g.Syktvykar, ul.
Kommunisticheskaja, 28, Institut biologii
Komi NTs UrO RAN, pat. pov. L.B. Pecherskoj**

(72) Inventor(s):

**Petrova Natal'ja Borisovna (RU),
Mojseenko Nelli Alekseevna (RU),
Volodin Vladimir Vital'evich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Institut biologii Komi nauchnogo tsentra
Ural'skogo otdelenija Rossijskoj akademii
nauk (RU)**

(54) **METHOD FOR DETERMINATION OF SYMPATIC-ADRENAL SYSTEM ACTIVITY**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, in particular ecological physiology and endocrinology.

SUBSTANCE: method for determination of sympatic-adrenal system (SAS) activity in human and animals includes blood analysis. Three blood samples diluted by 200 times are prepared, wherein the first one contains isotonic sodium chloride solution; the second (control) one contains fitohemagglutinine solution; and the third (tested) one contains fitohemagglutinine and propanolole solution. Then samples are incubated for 10 min and number of free non-

agglutinated erythrocytes is calculated under microscope in Gorjaev's chamber. Activity index (AI) is calculated according to formula: $AK = (Er - PP) / (Er - Contr) [100 \%$, wherein Er is erythrocyte amount in 0.85 % NaCl solution; Contr - is erythrocyte amount in fitohemagglutinine solution; and PP is erythrocyte amount in fitohemagglutinine and propanolole solution. When AK is less than 80 % SAS is recognized as non-active one.

EFFECT: method of increased accuracy.

4 ex

Изобретение относится к физиологии и медицине и может быть использовано в экологической физиологии, эндокринологии, а также в клинических и экспериментальных исследованиях для биотестирования различных гормональных и других биологически активных веществ, в том числе и фитоэкдистероидов.

5 Известны радиоиммунологические методы, методы ЯМР и флуоресцентных зондов для определения концентрации свободных и связанных с рецепторами катехоламинов (Справочник практического врача /Под ред. Воробьева А.И. М.: Медицина, 1992).

Недостаток этих методов заключается в необходимости использования сложной медицинской аппаратуры, специально оборудованных помещений и специально
10 обученного персонала, дорогостоящих реактивов.

Известен способ определения состояния (симпато-адреналовой системы) САС по антигемолизирующему эффекту при использовании метода гипоосмотического гемолиза эритроцитов в сочетании с ПП-тестом (Соминский В.Н., Соковнин В.М., Окунь К.В. Параметры кинетики взаимодействия пропранолола с мембраной эритроцитов у лиц с
15 различным антигемолизирующим эффектом этого препарата // Космическая биология и авиакосм. медицина, 1988, №3, С.86-88; Соминский В.Н., Бердышева Л.В., Блума Р.К. и др. Использование эритроцитов крови для прижизненной оценки функционального состояния адренорецепторов // Физиол. журн. СССР им. Сеченова, 1989, №2. с.189-193).

Недостаток известного способа заключается в необходимости относительно большого
20 количества крови и сложной математической обработке.

Известен способ оценки состояния симпатоадреналовой системы человека (SU 1422158, А1 07.09.1988), выбранный за прототип, сущность которого заключается в следующем. Из крови пациента отделяют эритроциты, трехкратно их отмывают в охлажденном физиологическом растворе, добавляют 8-10 мг ЭДТА к 1-2 мл эритроцитарной взвеси и
25 экстрагируют катехоламины (А и НА) в 0,4 н. надхлорной кислоте в течение 30 мин. После отделения белого хлопьевидного осадка путем центрифугирования сливают полученный супернатант и доводят рН до 8,5. Проводят адсорбционную колоночную хроматографию, в качестве сорбента используя окись алюминия. Проводят элюцию катехоламинов, двукратно добавляя 3,5 мл 0,25 н. уксусной кислоты для получения
30 уксуснокислого элюата и дальнейшего окисления катехоламинов. Элюат окисляют ферроцианидом калия в фосфатном буфере рН 4,2-6,2 для получения продуктов окисления А и НА. Измеряют флуоресценцию А и НА, регистрируют разницу опытных и контрольных проб и по их значению судят о тяжести заболевания.

Известный способ является многостадийным и трудоемким, что влияет на точность
35 результатов исследований.

Задачей изобретения является разработка нового способа определения состояния симпато-адреналовой системы.

Техническим результатом предложенного способа является повышение точности оценки САС, это позволяет использовать способ для мониторинга и экспресс-оценки САС
40 животных и человека.

Способ основан на методе фитогемагглютинации, предложенном Н.А.Моисеенко, Л.И.Иржаком для качественной характеристики гетерогенной популяции эритроцитов (Моисеенко Н.А., Иржак Л.И. Агглютинация эритроцитов кролика при напряженном эритропозе // Журн. общей биол., 1972. Т. 33. №6, С.779-786.4).

45 Мембрана эритроцитов содержит β -адренорецепторы и может отражать состояние адренорецепторов в других органах и тканях. Нами предложено использовать метод фитогемагглютинации в сочетании с ПП-тестом. ПП-тест позволяет сравнить исходный контрольный образец крови с фитогемагглютинами (ФГА) с имитацией *in vitro* его состояния при стрессе.

50 Технический результат достигается тем, что в способе определения функциональной активности симпато-адреналовой системы (САС) животных и человека, включающем исследование крови, согласно изобретению осуществляют приготовление трех проб крови разведенных в 200 раз, причем первой - с изотоническим раствором хлорида натрия,

второй контрольной - с раствором фитогемагглютининов; третьей опытной - с раствором фитогемагглютининов и пропранолола, инкубацию проб - в течение 10 минут, количественный подсчет под микроскопом в камере Горяева свободных неагглютинировавших эритроцитов, вычисляют показатель активности (АК) по формуле:

$$5 \quad АК = \frac{Эр - ПП}{Эр - Контр} \times 100\%,$$

где Эр - количество эритроцитов в 0,85% растворе NaCl;

Контр. - количество эритроцитов в растворе ФГА;

10 ПП - количество эритроцитов в растворе ФГА и пропранолола,

И при АК ниже 80% считают САС неактивной.

Способ осуществляется следующим образом.

В изобретении используется пропранолол (ПП) - неселективный

блокатор β -адренорецепторов и солевая вытяжка в 0,85% растворе NaCl

15 фитогемагглютинина из гороха посевного (*Pisum sativum* L.) (Мойсеенко Н.А., Иржак Л.И.

Агглютинация эритроцитов кролика при напряженном эритропоэзе // Журн. общей биол., 1972. Т. 33. №6, С.779-786). Раствор ФГА готовят экстрагированием их из размолотых семян гороха посевного (*Pisum sativum* L.) 0,85% раствором NaCl в течение 2-х суток в бытовом холодильнике при $t=4^{\circ}\text{C}$. Вес сухой навески к объему раствора NaCl как 1:5.

20 Полученную вытяжку фильтруют через обеззоленный фильтр.

Кровь с антикоагулянтом от человека или экспериментального животного, тщательно перемешанную в разведении 200 раз, набирают в эритроцитарные меланжеры и проводят количественное определение реакции агглютинации эритроцитов.

В первой пробе кровь разводят с 0,85% NaCl и определяют общее количество эритроцитов.

25 Вторую контрольную пробу разводят раствором ФАГ и определяют количество свободных, не вовлеченных в реакцию агглютинации эритроцитов.

Третью опытную пробу разводят раствором ФАГ+ПП и определяют количество свободных эритроцитов.

30 Подсчет эритроцитов, не подвергшихся агглютинации, проводят через 10 минут инкубации под микроскопом в камере Горяева в пяти больших квадратах. Вычисляют количество агглютинировавших эритроцитов по разнице между общим количеством эритроцитов (проба 1) и количеством свободных неагглютинировавших эритроцитов в пробах 2 и 3. Опытная проба 3 позволяет сравнить исходную агглютинабельность контрольного образца в растворе ФГА с имитацией *in vitro* его состояния при стрессе.

35 По способности β -адренорецепторов связываться с ПП определяют показатель активности симпато-адреналовой системы по простой математической формуле, в которой сравниваются степени агглютинации эритроцитов в контрольной (с ФГА) и опытной (с раствором ФГА и пропранолола) пробах.

$$40 \quad АК = \frac{Эр - ПП}{Эр - Контр} \times 100\%,$$

где АК - активность САС;

Эр - количество эритроцитов в 0,85% растворе NaCl;

Контр. - количество эритроцитов в растворе ФГА;

45 ПП - количество эритроцитов в растворе ФГА и пропранолола.

Экспериментально установлено, что симпато-адреналовая система не активирована, если показатель активности ниже 80%, т.е. имеются значительные различия в контрольной и опытной пробах.

Пример 1

50 Берут кровь с антикоагулянтом от интактной крысы, набирают в эритроцитарные меланжеры, при этом кровь набирают до метки 0,5, до метки 101 - раствор ФГА (контрольная проба), опытная проба - ФГА с ПП: до метки 0,5 - кровь, до 1 - ПП с концентрацией 10^{-6} моль/литр, до метки 101 - раствор ФГА. Содержимое меланжеров в

течение этого времени перемешивают. Осуществляют подсчет свободных неагглютинировавших эритроцитов в 5 больших квадратах.

Общее количество эритроцитов в 5 больших квадратах Эр. - 495; в контр. - 312, в ПП-пробе - 371.

$$5 \quad АК = \frac{(495 - 371)}{(495 - 312)} \times 100\% = \frac{124}{183} \times 100\% = 68\%$$

САС не активирована.

Пример 2

10 Осуществляют оценку САС по вышеописанному способу при введении экспериментальной крысе 20-гидроксиэктодизона (20 Е) в дозе 20 мг/кг из растения серпухи венценосной *S. coronata* L. (Володин В.В., Володина С.О. Способ получения эктодистероидов. Пат.2153346. Россия. МКИ ³A61K 35/78. Заявл. 29.03.1999. №99106351/14, Оpubл. 27.07.2000. // Б.И. 2000. №21).

Эр - 571; ПП - проба 399; контроль - 297 эр.

$$15 \quad АК = \frac{(571 - 399)}{571 - 297} \times 100\% = 63\%$$

САС не активирована.

Пример 3

20 Осуществляют оценку САС по вышеописанному способу после физической нагрузки (плавание в течение 40 минут) экспериментальной крысе.

Эр=480; контр. проба - 247; ПП-проба 273 эр.

$$АК = \frac{(480 - 273)}{(480 - 247)} \times 100\% = \frac{207}{233} \times 100\% = 89\%$$

25 САС умеренно активирована.

Пример 4

Осуществляют оценку САС по вышеописанному способу при введении экспериментальной крысе тироксина в дозе 30 мг/кг веса.

Эр=580; контр. проба 352; ПП-проба 368 эр.

$$30 \quad АК = \frac{(580 - 368)}{580 - 352} \times 100\% = \frac{212}{228} \times 100\% = 93\%$$

САС значительно активирована.

35 Экспериментально установлено и подтверждено, что чем ближе показатель АК к 100%, тем выше активность САС. Наименьшая активность САС у интактной крысы и у крысы, которой вводился 20-Е; у животных при введении тироксина и физической нагрузке (стрессорный фактор) отмечена более высокая активность САС, максимальная при введении тироксина.

40 Таким образом, предлагаемый способ прост и не требует специальной подготовки и может быть проведен параллельно с клиническим определением общего количества эритроцитов в крови.

45 Способ легко реализуется в обычных клинических лабораториях, не требует сложного оборудования. Необходимое для анализа количество крови можно брать из отходов крови с антикоагулянтном, которые обычно остаются в клинических лабораториях после ряда стандартных анализов, или получать проколом кожи людей, лабораторных и диких животных. Важно лишь, чтобы хранились они без замораживания не более 24 часов после их изъятия из организма. Высокая чувствительность предлагаемого способа допускает применение его для оценки степени адаптированности людей и животных к условиям деятельности и среды обитания, а также функциональных резервов организма.

50 Формула изобретения

Способ определения функциональной активности симпато-адреналовой системы (САС) животных и человека, включающий исследование крови, отличающийся тем, что осуществляют приготовление трех проб крови разведенных в 200 раз, причем первой - с

изотоническим раствором хлорида натрия, второй контрольной - с раствором фитогемагглютининов; третьей опытной - с раствором фитогемагглютининов и пропранолола, инкубацию проб в течение 10 мин, количественный подсчет под микроскопом в камере Горяева свободных неагглютинировавших эритроцитов, и

5 вычисляют показатель активности (АК) по формуле

$$АК = \frac{Эр - ПП}{Эр - Контр.} \times 100\%,$$

где Эр - количество эритроцитов в 0,85% растворе NaCl;

Контр. - количество эритроцитов в растворе ФГА;

10 ПП - количество эритроцитов в растворе ФГА и пропранолола, и при АК ниже 80% считают САС не активной.

15

20

25

30

35

40

45

50