

© Гумінський Ю.Й., Очеретна Н.П.

УДК: 611.41:615.348:599.323.4

Гумінський Ю.Й., Очеретна Н.П.

Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова (вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, Україна, 21018)

## ДИНАМІКА МОРФОЛОГІЧНИХ ЗМІН В СЕЛЕЗІНЦІ ЩУРІВ У РАННІ ТЕРМІНИ ПІСЛЯ ОПІКУ ШКІРИ 2-3 СТУПЕНЯ ПЛОЩЕЮ 21-23 % ПОВЕРХНІ ШКІРИ ТА ЇХ КОРЕКЦІЯ ІНФУЗІЙНИМ РОЗЧИНОМ HAES-LX-5%

**Резюме.** У щурів без опіку шкіри, які отримували розчин HAES-LX 5% на протязі семи діб, гістологічна структура селезінки була подібною до такої у щурів які отримували 0,9 % розчин NaCl. Встановлено виражені деструктивні та дистрофічні зміни структури селезінки після опікової травми шкіри у щурів, яким вводили 0,9 % розчин NaCl через 1, 3 та 7 діб після опікової травми. Застосування HAES-LX5% значно зменшує дистрофічні та деструктивні зміни структури селезінки в ранні терміни після опікової травми в порівнянні з щурами, яким після опіку вводили ізотонічний розчин, що вказує на здатність препарату зменшувати негативний вплив факторів опіку шкіри на імункомпетентні клітини.

**Ключові слова:** морфологія, опікова хвороба, селезінка, HAES-LX 5%.

### Вступ

Удосконалення методів лікування опікової хвороби за останній час практично не вплинуло на прогноз для життя при важкій термічній травмі. Однією з найчастіших причин смерті при опіковій хворобі на ранніх термінах після отримання травми є опіковий шок та поліорганна недостатність [Гусак та ін., 2000; Гусак и др., 2002; Ермолов та ін., 2009]. Тому активно проводиться розробка сучасних трансфузійних препаратів, які нормалізують електролітний склад крові в умовах опікового шоку. Новий вітчизняний комплексний колоїдно-гіперосмолярний інфузійний препарат HAES-LX 5%, був розроблений в лабораторії технології ДУ "Інститут патології крові та трансфузійної медицини АМН України" [Кондрацький та ін., 2011]. На зменшення рівня ендогенної інтоксикації в організмі щурів після опіку шкіри 2-3 ступеня, площею 21-23 % поверхні тіла при корекції інфузійним розчином HAES-LX 5%, та гепатопротекторну дію даного препарату в умовах експериментальної опікової хвороби вказують дослідження, що провели І.В. Гунас із співавт. [2012], а також А.І. Семененко, М.С. Пушкар і А.П. Король [2011]. Однак дослідження динаміки мікроскопічних змін структури селезінки щурів за умов корекції впливу факторів опікового шоку гіперосмолярним розчином HAES-LX 5% в ранні терміни після опіку шкіри не проведено.

**Метароботи** - встановити динаміку макро- та мікроскопічних змін у селезінці щурів через 1, 3 й 7 діб після опікової травми шкіри 2-3 ступеня важкості, площею 21-23 % поверхні тіла на тлі введення фізіологічного розчину, або колоїдно-гіперосмолярного розчину HAES-LX 5%.

### Матеріали та методи

Експериментальне дослідження дії фізіологічного розчину або інфузійного препарату HAES-LX 5%, на структуру селезінки в ранні терміни (через 1, 3 та 7 діб) після опікової травми шкіри були виконані на лабораторних білих щурах-самцях масою 150-160 г, отриманих з віварію ДУ "Інститут фармакології та токсикології

АМН України". Всі тварини утримувались на стандартному водно-харчовому раціоні, при вільному доступі до води та їжі у вигляді збалансованого комбікорму за встановленими нормами. Дослідження проводили на базі науково-дослідного центру Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова, сертифікованій ДФЦ МОЗ України (свідоцтво про атестацію вимірювальної лабораторії №003\10, видане 11 січня 2010 року, чинне до 10 січня 2015 року).

Щури були розподілені на 4 групи (по 9 тварин в кожній): 1 - щурі без опіку, яким проводили інфузію 0,9 % розчину NaCl у дозі 10 мл на кг; 2 - щурі без опіку, яким проводили інфузію HAES-LX 5%, у дозі 10 мл на кг; 3 - щурі після опіку шкіри, яким проводили інфузію 0,9% розчину NaCl у дозі 10 мл на кг; 4 - щурі після опіку шкіри, яким проводили інфузію HAES-LX 5%, у дозі 10 мл на кг. Під час роботи з лабораторними тваринами дотримувались: правил гуманного відношення до експериментальних тварин та вимог, затверджених комітетом з біоетики Вінницького національного медичного університету (протокол № 5 від 4 березня 2010 року); Міжнародних вимог про гуманне поводження з тваринами, дотримуючись правил "Європейської конвенції захисту хребетних тварин, яких використовують з експериментальною та іншою науковою метою"; методичних рекомендацій ДФЦ МОЗ України "Доклінічні дослідження лікарських засобів". Евтаназію щурів протягом усього експерименту проводили шляхом декапітації після попереднього пропофолового наркозу (60 мг/кг внутрішньовенно).

Як досліджуваний фармакологічний засіб був використаний колоїдно-гіперосмолярний розчин HAES-LX-5%, який містить в якості колоїдної основи полі(0-2-гідроксиетил)крохмалю (середня молекулярна маса 130 000 Дальтон, ступінь молекулярного заміщення 0,4) - 5 %, а також багатоатомний спирт ксилітол - 5 %, залужнювальний компонент натрію лактат - 1,5 %, натрію хлорид - 0,8 %, калію хлорид - 0,03 %, кальцію хлорид - 0,02 %, магнію хлорид - 0,01 %. Іонний склад препара-

ту:  $\text{Na}^+$  - 270,7 ммоль/л,  $\text{K}^+$  - 4,0 ммоль/л,  $\text{Ca}^{++}$  - 1,8 ммоль/л,  $\text{Mg}^{++}$  - 1,1 ммоль/л,  $\text{Cl}^-$  - 146,6 ммоль/л,  $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COO}^-$  - 133,8 ммоль/л. Теоретична осмолярність препарату - 890 мосмоль/л [Кондрацький та ін., 2011].

Опікову травму викликали шляхом прикладання до бічних поверхонь тулуба щурів чотирьох мідних пластинок (по дві пластини з кожного боку), які попередньо на протязі 6 хвилин нагрівали у воді з постійною температурою 100°C. Площа поверхні кожної пластини 13,86 см. Загальна площа ураження у щурів складала 21-23 %. Така площа при експозиції 10 секунд є достатньою для формування опіку 2-3 ступеню (згідно класифікації прийнятій на 20 з'їзді хірургів України, вересень 2000 р. м. Тернопіль) та викликання шокового стану середнього ступеню важкості [Шано и др., 2006].

Зміни морфологічної структури селезінки вивчали через 1, 3, та 7 діб від початку експерименту. Для гістологічного дослідження фрагменти селезінки фіксували в 10 % розчині нейтрального формаліну, промивали в проточній воді, обезводнювали в батареї спиртових розчинів зростаючої концентрації та заключали в паропласт. Зрізи товщиною 3-5 мкм. Виготовляли на ротаційному мікротомі, забарвлювали гематоксилін еозином та по Ван-Гізон. Гістологічні препарати досліджували в світловому мікроскопі OLYMPUS BH-2 з використанням об'єктивів x10 та x40, окуляра x10.

### Результати. Обговорення

У щурів без опіку, яким на протязі семи діб проводили інфузію 0,9 % розчин NaCl у дозі 10 мл на кг, або розчину HAES-LX 5% в аналогічній дозі гістологічна структура селезінки подібна до такої у інтактних щурів [Стаценко, 2009].

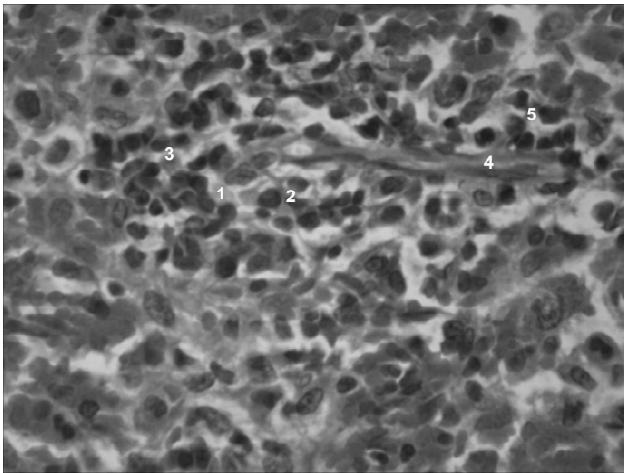
В селезінці у щурів, яким після опікової травми шкіри проводили інфузію 0,9 % розчину NaCl у дозі 10 мл на кг через добу після опіку виникав комплекс дисциркуляторних та альтеративно-атрофічних процесів, що в значній мірі обумовлено опіковим шоком. Процеси альтерації переважали в лімфоїдних фолікулах над іншими реакціями, тобто лімфоцитоліз в селезінці в значній мірі підтримувався агресивними факторами опікового шоку. В кінці періоду опікового шоку та на стадії токсикосептицемії в лімфоїдних фолікулах переважали явища лімфоцитолізу при активації макрофагоцитів на фоні циркуляторних розладів. В переважній більшості функціональних Т- і В-залежних зон селезінки було відмічено зниження чисельності лімфоцитів за рахунок некрозу та апоптозу лімфоцитів, особливо в гермінативних центрах лімфоїдних фолікулів, що спостерігалось до 7 доби після нанесення опіків. В червоній пульпі селезінки чисельність лімфоїдних клітин найбільш суттєво знижена через 7 діб після опікової травми. Спостерігали активацію макрофагів у всіх функціональних зонах лімфоїдних вузликів селезінки. При цьому кількість макрофагів значно виросла через 7 діб

після опіку шкіри. Більшість макрофагів характеризувалась помірною й значною фагоцитарною активністю та містила чисельні фагосоми й включення. При цьому, в лімфоїдних вузликах селезінки зберігаються ознаки антигенної стимуляції, що морфологічно підтверджується наявністю гермінативних центрів у всіх лімфоїдних фолікулах білої пульпи селезінки (рис. 1), збільшенням чисельності бластів в гермінативних центрах, накопиченням макрофагів і плазмоцитів та їх кооперації в червоній пульпі селезінки.

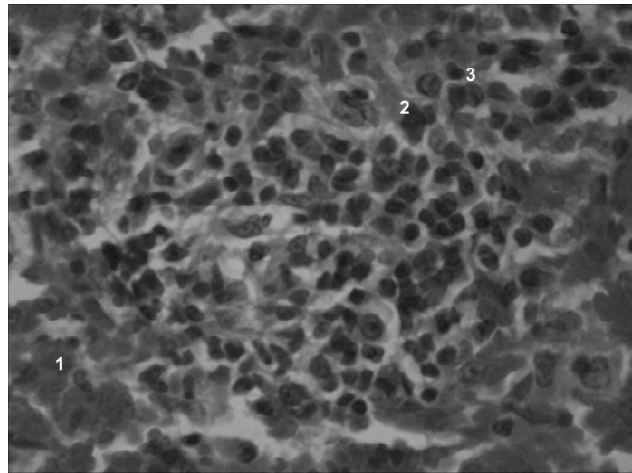
Через добу після опікової травми шкіри у щурів яким вводили розчин HAES-LX-5% у дозі 10 мл на кг зміни в будові строми та паренхіми менше виражені, ніж у щурів яким після опікової травми шкіри проводили інфузію 0,9 % розчину NaCl. Так кровоносні судини в трабекулах селезінки помірно повнокровні. Кількість лімфоїдних вузликів селезінки така як і у щурів без опіку, яким проводили інфузію розчину HAES-LX-5% у дозі 10 мл на кг. В крайовій зоні лімфоїдних вузликів селезінки зменшена чисельність лімфоцитів. Гермінативні центри в деяких лімфоїдних вузликах селезінки збільшені в розмірах. В гермінативних центрах лімфоїдних вузликів селезінки визначали збільшення чисельності малодиференційованих клітин. В більшій частині лімфоїдних вузликів селезінки переважали лімфоцити з нормохромними ядрами, тоді як у щурів, яким після опіку шкіри проводили інфузію 0,9 % розчину NaCl переважали лімфоцити з гіпо та гіперхромними ядрами. Синусоїдні судини селезінки були розширені, повнокровні в їх просвітах були наявні чисельні макрофаги зрілі та не зрілі плазматичні клітини. В тяжках червоної пульпи були наявні чисельні вогнища плазматичних клітин з перевагою плазмобластів. Площа червоної пульпи збільшена за рахунок повнокров'я синусоїдних судин селезінки. Кровоносні судини в трабекулах селезінки повнокровні. Набряк периваскулярної сполучної тканини менше виражений, ніж у щурів яким після опіку шкіри проводили інфузію 0,9 % розчину NaCl (рис. 2).

Таким чином ми можемо констатувати той факт, що через добу після опікової травми шкіри у щурів яким вводили розчин HAES-LX-5% у дозі 10 мл на кг дистрофічні та деструктивні процеси, а також розлади гемодинаміки в кровоносних судинах в селезінці були менше виражені, ніж у щурів яким після опіку шкіри проводили інфузію 0,9 % розчину NaCl в аналогічній дозі.

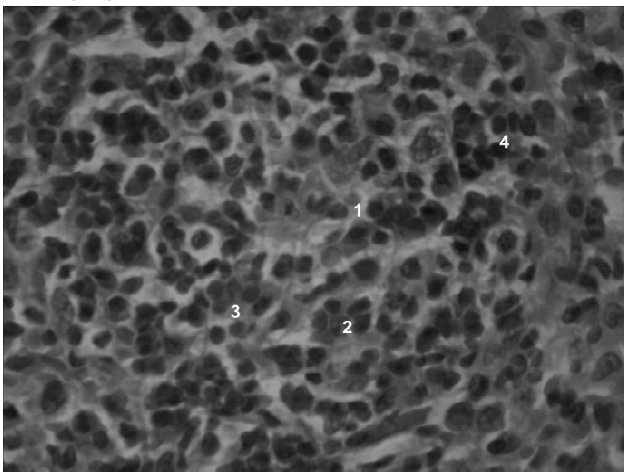
Через 3 доби у щурів яким після опікової травми шкіри проводили інфузію розчину HAES-LX-5% зміни в будові строми та паренхіми селезінки більше виражені ніж у щурів яким після опікової травми шкіри вводили 0,9 % розчину NaCl в той же термін спостереження. Через 3 доби після опікової травми шкіри у щурів кровоносні судини в трабекулах селезінки повнокровні. Кількість лімфоїдних фолікулів така як і у щурів, яким вводили розчин HAES-LX-5% без опіку. Лімфоїдні фолікули мали не чіткі межі. Центри розмноження визначали у всіх лімфоїдних фолікулах (рис. 3). Синусоїдні



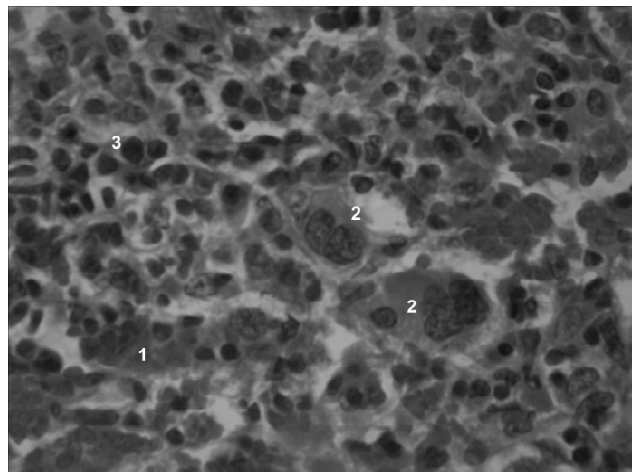
**Рис. 1.** Фрагмент селезінки щурів через 7 днів після опікової травми шкіри, яким проводили інфузію 0,9 % розчином NaCl: 1 - гермінативний центр; 2 - лімфообласти; 3 - світлі лімфоцити; 4 - вузликова артерія; 5 - періартеріальна зона білої пульпи. Забарвлення гематоксилін-еозин. Об'єктив x 40. Окуляр x 10.



**Рис. 2.** Фрагмент селезінки у щурів яким вводили розчин HAES-LX-5% через 1 добу після опікової травми шкіри: 1 - просвіти синусоїдних судин селезінки; 2 - макрофаги; 3 - плазмоцити. Забарвлення гематоксилін-еозин. Об'єктив x 40. Окуляр x 10.



**Рис. 3.** Фрагмент селезінки у щурів яким вводили розчин HAES-LX-5% через три доби після опікової травми шкіри: 1 - гермінативний центр; 2 - лімфообласти; 3 - світлі лімфоцити; 4 - плазматичні клітини в крайовій зоні. Забарвлення гематоксилін-еозин. Об'єктив x 40. Окуляр x 10.



**Рис. 4.** Фрагмент селезінки у щурів яким вводили розчин HAES-LX-5% через 7 днів після опікової травми шкіри: 1 - розширені просвіти синусоїдних судин селезінки; 2 - активні макрофаги; 3 - плазмоцити. Забарвлення гематоксилін-еозин. Об'єктив x 40. Окуляр x 10.

судини селезінки повнокровні в їх просвітах наявні чисельні макрофаги, зрілі та не зрілі плазматичні клітини. В тяжках червоної пульпи розташовані чисельні вогнища накопичення макрофагів та еритроцитів, або макрофагів, лімфоцитів і плазмоцитів з перевагою плазмобластів. Трабекули селезінки місцями потовщені внаслідок переповнення кров'ю кровоносних судин мікроциркуляторного русла, а також внаслідок інфільтрації їх макрофагами. На відміну від будови селезінки у щурів, яким після опіку вводили 0,9 % розчину NaCl не зустрічали ділянки дрібних крововиливів.

Через 7 днів після опікової травми шкіри у щурів яким вводили розчин HAES-LX-5% зміни в будові строми та паренхіми більш виражені, ніж в попередній групі тварин. Кількість лімфоїдних фолікулів збільшена. Відміча-

ли окремі збільшені в розмірах фолікули в порівнянні з такими у контрольних щурів. У центрах розмноження серед лімфоцитів з темними ядрами розташовані лімфоцити з світлими ядрами, що містили декілька ядерць. Це вказує на активацію синтетичних процесів в цих клітинах. В крайовій зоні лімфоїдних фолікулів розташовані чисельні плазмобласти та плазмоцити. Центри розмноження визначали у всіх фолікулах, що вказує на антигенну стимуляцію. Ядра в лімфоцитах забарвлювались нормохромно. Синусоїдні судини селезінки повнокровні в їх просвітах наявні чисельні макрофагоцити, зрілі та не зрілі плазматичні клітини (рис. 4). В червоній пульпі розташовані чисельні вогнища макрофагоцитів, лімфоцитів, плазмоцитів. В червоній пульпі селезінки відбуваються дистрофічні та деструк-

тивні процеси, однак вони менше виражені ніж у щурів, яким в аналогічний строк після опікової травми шкіри вводили 0,9 % розчин NaCl.

Таким чином, позитивний терапевтичний ефект використання HAES-LX-5% у дозі 10 мл на кг маси тіла при опіковій хворобі в значній мірі пов'язаний зі стимуляцією компенсаторних процесів в білій пульпі селезінки. Введення HAES-LX-5% в групі тварин з опіками призводило до гальмування лімфоцитозу та атрофічних процесів в селезінці, прискорювало регенерацію імунотетентних клітин, стимулюючи, перш за все, гуморальну ланку імунної відповіді, що морфологічно підтверджується значним збільшенням чисельності плазмоцитів і макрофагів в білій та червоній пульпі селезінки.

### Висновки та перспективи подальших розробок

1. У тварин яким після опіку шкіри вводили 0,9 % розчин NaCl у дозі 10 мл на кг маси тіла виявляли

розлади кровообігу та дистрофічні й деструктивні зміни в білій та червоній пульпі селезінки, які прогресували від першої до сьомої доби спостереження.

2. У тварин, які після опікової травми шкіри на протязі семи діб отримували розчин HAES-LX-5% дистрофічні та деструктивні зміни в будові строми та паренхіми селезінки були значно менш виражені, ніж у щурів яким в аналогічний строк після опікової травми шкіри вводили 0,9 % розчин NaCl.

3. Позитивний терапевтичний ефект препарату HAES-LX-5% у дозі 10 мл на кг маси тіла обумовлений зменшенням лімфоцитозу та атрофічних процесів, а також із стимуляцією компенсаторних процесів в білій пульпі селезінки.

Проведене дослідження структурних змін селезінки при експериментальній опіковій хворобі показало доцільність застосування сучасного медикаментозного засобу HAES-LX-5% з метою попередження дистрофічних та деструктивних змін в селезінці в умовах опікового шоку.

### Список літератури

- Динаміка змін рівня ендогенної інтоксикації в організмі щурів протягом місяця після опіку шкіри II-III ступеня, площею 21-23 % поверхні тіла та її корекція інфузійними розчинами Лактопротеїну з сорбітолом та HAES-LX-5% / І.В. Гунас, Б.О. Кондрацький, І.К. Нурметова [та ін.] // Укр. морф. альманах. - 2012. - Т. 10, № 4. - С. 29-34.
- Допитання про діагностичні критерії системної запальної відповіді при опіковому шоку / В.К. Гусак, В.П. Шано, О.І. Міміношвілі [та ін.] // Комбустиологія на рубежі століть: мат. Міжнар. конгресу. - Москва, 2000. - С. 45-46.
- Ожоговый шок / В.П. Шано, В.К. Гринь, Э.Я. Фисталь [и др.]. - Донецк, Юго-Восток, 2006. - 176 с.
- Ожоговый шок: оптимизация интенсивной терапии / В.К. Гусак, В.П. Шано, Ю.В. Заяц [и др.] // Укр. мед. часопис. - 2002. - Т. 31, № 5. - С. 84-88.
- Патент 93776, Україна, МПК А61К9/08. Комплексний колоїдно-гіперосмолярний інфузійний препарат / Кондрацький Б.О., Новак В.Л., Кондрацький Я.Б. // Заявка № а 2009 08880; заявл. 25.08.99; опубл. 10.03.2011, Бюл. № 5. - 12 с.
- Семенов А.І. Морфологічні особливості печінки щурів на ранніх стадіях опікової хвороби при інфузійній терапії колоїдно-гіперосмолярними розчинами / А.І. Семенов, М.С. Пушкар, А.П. Король // Вісник морфології. - 2011. - Т. 17, № 2. - С. 285-289.
- Синдром полиорганной недостаточности у обожженных: проблемы диагностики, профилактики и лечения / А.С. Ермолов, С.В. Смирнов, Л.И. Герасимова [и др.] // Комбустиология. - 2009. - № 1. - С. 23-27.
- Стаценко Е.А. Ультроструктура селезенки интактных половозрелых крыс / Е.А. Стаценко // Укр. мед. альманах. - 2009. - Т. 12, № 6. - С. 180-182.

*Гуминский Ю.И., Очеретная Н.П.*

### ДИНАМИКА МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В СЕЛЕЗЁНКЕ КРЫС В РАННИЕ СРОКИ ПОСЛЕ ОЖОГА КОЖИ 2-3 СТЕПЕНИ ПЛОЩАДЬЮ 21-23 % ПОВЕРХНОСТИ КОЖИ И ИХ КОРРЕКЦИЯ ИНФУЗИОННЫМ РАСТВОРОМ HAES-LX-5%

**Резюме.** У крыс без ожога кожи, получающих раствор HAES-LX 5% на протяжении семи дней, гистологическая структура селезёнки была подобной крысам, получающим 0,9 % раствор NaCl. Установлены выраженные деструктивные и дистрофические изменения структуры селезёнки после ожоговой травмы кожи у крыс, которым вводили 0,9 % раствор NaCl через 1, 3 и 7 дней после ожоговой травмы. Применение HAES-LX5% значительно уменьшает дистрофические и деструктивные изменения структуры селезёнки в ранние сроки после ожоговой травмы в сравнении с крысами, которым после ожога вводили изотонический раствор, что указывает на способность препарата уменьшать негативное влияние факторов ожога кожи на иммунокомпетентные клетки.

**Ключевые слова:** морфология, ожоговая болезнь, селезенка, HAES-LX 5%.

*Guminskyi Yu.Yo., Ocheretna N.P.*

### DYNAMICS OF MORPHOLOGICAL CHANGES IN THE SPLEEN OF THE RATS EARLY AFTER BURN OF THE SKIN OF 2-3 DEGREE AND 21-23 % AREA OF BODY SURFACE AND THEIR CORRECTION BY INFUSION SOLUTION HAES-LX-5%

**Summary.** The histological structure of the spleen in rats without skin burning and receiving HAES-LX % solution for seven days was similar as in rats receiving 0,9 % solution of NaCl. An expression destructive and dystrophic changes in the structure of the spleen after a burn injury of the skin in rats treated with 0,9 % NaCl solution in 1, 3 and 7 days after thermal injury are established. Application of HAES-LX 5% significantly reduces dystrophic and destructive changes in the structure of the spleen in the early terms after burn injury compared with rats that were administered after burn isotonic solution that indicates the ability of the drug to reduce the negative impact of factors skin burning on immunocompetent cells.

**Key words:** morphology, burn disease, spleen, HAES-LX 5%.

Стаття надійшла до редакції 18.03.2013 р.

Гумінський Юрій Йосипович - д.мед.н., професор, завідувач кафедри нормальної анатомії, проректор з навчальної роботи Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова; guminsky@vsmu.vinnica.ua;  
Очеретна Наталія Петрівна - асистент кафедри анатомії людини Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова; (093) 9311671.

© Ільченко О.В., Михайлова І. В., Сулім О. Г.

УДК: 577.112.386:612.11:543.544

Ільченко О.В.\*, Михайлова І. В.\*\*\*, Сулім О. Г.\*

Вінницький Національний медичний університет імені М.І. Пирогова, \*кафедра біологічної та загальної хімії; \*\*кафедра фармацевтичної хімії (вул. Пирогова 56, м. Вінниця, Україна, 21018)

## ВИЗНАЧЕННЯ ГОМОЦИСТЕЇНУ В ПЛАЗМІ КРОВІ МЕТОДОМ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ НА ОСНОВІ п-ХЛОРМЕРКУРИБЕНЗОАТ НАТРІЮ

**Резюме.** Розроблено спосіб кількісного визначення гомоцистеїну в плазмі крові методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). Обґрунтовано новий підхід до процедури депротейнізації досліджуваного розчину шляхом осадження білків ацетонітрилом з подальшим видаленням його екстракцією в хлороформі. Для хроматографічного дослідження отриманого таким чином водного розчину гомоцистеїну було запропоновано використовувати оптично активний модифікатор пара-хлормеркурібензоат натрію (п-ХМБ), взаємодія якого з цистеїном та гомоцистеїном є кількісною та характеризується достатньою стійкістю утворених кон'югатів. Разом з суттєвим зменшенням собівартості досліджень це робить даний метод доступним для клінічного використання.

**Ключові слова:** гомоцистеїн, п-хлормеркурібензоат натрію, високоефективна рідинна хроматографія.

### Вступ

Той факт, що підвищений вміст гомоцистеїну в крові є незалежним фактором ризику серцево-судинних та деяких інших захворювань, вже став незаперечним. Визначення концентрації гомоцистеїну також дозволяє оцінити статус фолату та вітаміну В12.

Існує кілька методів визначення цистеїну та гомоцистеїну в плазмі крові. Найбільш важливими з них є методи в основі яких лежить високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ). Проте часто використання ВЕРХ ускладнюється з деяких причин.

По-перше, досліджувані речовини присутні в організмі людини у вигляді окислених похідних - дисульфідів, білкових кон'югатів, що вимагає їхнього попереднього відновлення, причому відновлені (тіольні) форми знову швидко окислюються. Так, відповідно до деяких досліджень [Kleinman, Richie, 2000] протягом 30 хвилин втрачається близько 75% доданого до плазми крові відновленого глутатіону (GSH), що проявляється формуванням дисульфідів типу GS-SG (24%) та CS-SG (74%). Подібні зміни мають місце і для інших тіолів, що додаються до плазми крові.

По-друге, концентрація вільного гомоцистеїну в плазмі крові досить невисока і становить 1,57 мкмоль/л, що складає 10-15% від вмісту загального гомоцистеїну [Gautier et al., 1999].

По-третє, речовини типу цистеїну, гомоцистеїну слабо поглинають в середньому та ближньому ультрафіолеті, що ускладнює їх безпосереднє спектрофотометричне визначення і вимагає попередньо проводити перед- або післяколонкову дериватизацію - приєднання флуоресцентної мітки або оптично активної функціональної групи [Пентюк та ін., 2001; Zappacosta et al., 2002].

Можливе також пряме визначення гомоцистеїну в

далекому ультрафіолеті при 190 нм [Jayatilleke, Shaw, 1993]. При цьому не потрібно проводити дериватизацію та відновлення окислених форм гомоцистеїну. Але такий метод потребує дорогих надчистих реактивів та є трудомістким, а його чутливість є невисокою. Доступними для клінічного використання також є методи, засновані на використанні моноклональних антитіл проти гомоцистеїну в його імуноферментному варіанті або з застосуванням техніки поляризації флуоресценції [Brunelli et al., 2001]. Нещодавно був запропонований ензиматичний метод визначення гомоцистеїну, заснований на переносі метильної групи D-метионінметилсульфонію на гомоцистеїну (за участю гомоцистеїнметилтрансферази), з наступним вивільненням D-метионіну, його окисленні оксидазою D-амінокислот з визначенням утвореного пероксиду водню пероксидазним методом [Matsuyama et al., 2001]. Існуючі методи визначення гомоцистеїну в біологічних пробах в усякому випадку характеризуються високою собівартістю досліджень, що в 10-20 разів перевищує собівартість більшості стандартних біохімічних процедур, наприклад, визначення холестерину плазми. В значній мірі це обумовлено дороговизною відновника та флуоресцентної мітки. Вартість відновників складає: ТСЕР - 40-45 доларів США за 1 г, дитіеритріолу та дітіотреїтолу - 10-12 доларів США за 1 грам. Такий достатньо дешевий відновник, як тетрагідроборат натрію, ціною 1 долар США за 1 грам, - тверда речовина. Через її нестійкість робота з нею вимагає високої кваліфікації персоналу, що ускладнює проведення масових рутинних досліджень.

Вартість таких флуоресцентних модифікаторів як SBD-F, ABD-F, NDB, DBD-F, монобромбіману, йодацетамидофлуоресцеїну може складати від 2 до 5 тисяч