

Винахід стосується медицини, а саме лабораторної діагностики і може бути використаний для оцінки активності оксиду азоту синтази у хворих із захворюваннями внутрішніх органів.

Оксид азоту є основною вазодилатуючою речовиною в організмі, а також відіграє важливу роль у процесах імунітету та функціонуванні нервової системи. Про процеси синтезу оксиду азоту в організмі, можна судити по активності оксиду азоту синтази. Реєстрація активності оксиду азоту синтази біологічних об'єктів та подальший аналіз отриманих даних, дозволяють використовувати їх як об'єктивні критерії синтезу оксиду азоту в організмі. На фоні стабільності показників активності оксиду азоту синтази в нормі, зрушення, обумовлені дією тих чи інших фізіологічних або патологічних агентів, легко виявляються та фіксуються. Аналіз цих даних дозволяє адекватно відобразити процеси, що протікають у біологічній системі, що вказує на необхідність здійснювати оцінку активності оксиду азоту синтази як у нормі, так при різних патологічних станах.

Відомий спосіб оцінки активності оксиду азоту синтази, що полягає в наступному:

1. Отримують артеріальні судини, що містять ендотеліальні клітини, які є джерелом оксиду азоту синтази, безпосередньо після забою лабораторних тварин.
2. Фіксують артеріальні судини у 4% розчині параформальдегіду протягом 1 години стандартним способом.
3. Виготовляють мікропрепарати артеріальних судин стандартним способом.
4. Інкують отримані мікропрепарати в буферному розчині, що містить 0,3% Тритону X-100, 0,1мг/мл нітросинього тетразоліа, 1мг/л нікотинамід-аденін-динуклеотид-фосфату-відновленого протягом 1 години в темноті.
5. Зупиняють реакцію, додаючи 70% етанол.
6. Проводять мікроскопічне дослідження мікропрепарату стандартним методом.
7. Активність оксиду азоту синтази, оцінюють по ступеню зміни забарвлення ендотеліальних клітин.  
(Poppa V., Miyashiro J.K., Marshall A. et al. Endothelial NO synthase is increased in regenerating endothelium after denuding injury of the rat aorta // Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. - 1998. - Vol.18. - P.1312-1321.)

Суттєвими ознаками аналогу винаходу, що збігаються, є такі:

1. Одержання біологічного матеріалу, що містить клітини, які є джерелом оксиду азоту синтази.
2. Інкубація в розчині, що містить нітросиній тетразолій і нікотинамід-аденін-динуклеотид-фосфат-відновлений.

Однак, при використанні цього способу визначення активності оксиду азоту синтази, одержання біологічного матеріалу, що містить ендотеліальні клітини можливо тільки з трупного або біопсійного матеріалу. Отримання матеріалу вказаним способом і наступні процедури, пов'язані з підготовкою зразків для дослідження, можуть негативно вплинути на показники активності оксиду азоту синтази. Процедура одержання біологічного матеріалу, що містить клітини ендотелію вказаним способом робить його мало придатним для використання у клінічних дослідженнях через особливості отримання матеріалу та й тому, що не дозволяє простежити динаміку зміни активності оксиду азоту синтази у хворих при різних патологічних станах. До того ж оцінка активності оксиду азоту синтази проводиться напівкількісним способом. Цей спосіб хоч і дозволяє принципово оцінити активність оксиду азоту синтази, однак точність і достовірність отриманих даних буде досить низькою.

Найбільш близьким за технічною сутністю та досягаємим технічним результатом є спосіб оцінки активності оксиду азоту синтази, що полягає в наступному:

1. Одержують артеріальні судини, що містять ендотеліальні клітини, які є джерелом оксиду азоту синтази, безпосередньо після забою лабораторних тварин.
2. Виготовляють мікропрепарати артеріальних судин стандартним способом, використовуючи кріотом.
3. Фіксують отримані мікропрепарати у 4% розчині параформальдегіду протягом 30 хвилин стандартним способом.
4. Інкують отримані мікропрепарати в буферному розчині, що містить 0,2% Тритону X-100 протягом 30 хвилин.
5. Інкують отримані мікропрепарати в розчині, що містить 0,2ммоль/л нітросинього тетразоліа, 1ммоль/л нікотинамід-аденін-динуклеотид-фосфату-відновленого протягом 20 хвилин.
6. Поміщають мікропрепарат на предметний столик мікроскопу, обладнаного відеокамерою.
7. Захоплюють зображення мікропрепарату за допомогою відеограберу стандартним способом.
8. Визначають кількість формазау за допомогою комп'ютерної системи аналізу зображення в умовних одиницях на одну клітину.
9. Оцінку активності оксиду азоту синтази визначають по кількості гранул формаза на ендотеліальну клітину.  
(Channon K.M., Qian H., Neplioueva V. et al. In vivo gene transfer of nitric oxide synthase enhances vasomotor function in carotid arteries from normal and cholesterol-fed rabbits //Circulation. - 1998. - Vol.98. - P.1905-1911.)

Спільними суттєвими ознаками прототипу і способу, що заявляється є:

1. Одержання біологічного матеріалу, що містить клітини, які є джерелом оксиду азоту синтази.
2. Інкубація в розчині, що містить нітросиній тетразолій і нікотинамід-аденін-динуклеотид-фосфат-відновлений.
3. Визначення кількості формаза.

Незважаючи на те, що таким способом можливо визначати активність оксиду азоту синтази, однак процедура одержання біологічного матеріалу, який є джерелом оксиду азоту синтази некоректна, не тільки тому, що порушує цілісність організму, та й тим, що отримання таким способом біологічного матеріалу, може призвести до зміни показників активності оксиду азоту синтази, що негативно відобразиться на точності і достовірності отриманих даних. Крім цього оцінка кількості формаза проводиться напівкількісним методом і отримані данні представлені в умовних одиницях. Аналіз отриманих результатів дає лише приблизні дані про активність оксиду азоту синтази. Застосування мікроскопу з комп'ютерною системою аналізу зображення хоч і дозволяє точно оцінювати ступінь забарвлення мікропрепарату, але в досліджувану частину мікропрепарату можуть потрапити не тільки ендотеліальні клітини, що містять гранули формаза, але і м'язові клітини, що може вносити неточність в результат аналізу. Вказані вище причини в підсумку значною мірою погіршують точність, достовірність, а особливо відтворюваність результатів дослідження.

В основу винаходу поставлена задача удосконалення способу оцінки активності оксиду азоту синтази шляхом використання іншого біологічного матеріалу для дослідження та зміни методики визначення кількості формаза, що забезпечить підвищення достовірності, точності і відтворюваності результатів дослідження.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі оцінки активності оксиду азоту синтази, що полягає в одержанні біологічного матеріалу, що містить клітини, які є джерелом оксиду азоту синтази, інкубації в розчині, що містить нітросиній тетразолій і нікотинамід-аденін-динуклеотид-фосфат-відновлений, та визначенні кількості

формазау, новим є те, що як біологічний матеріал використовують суспензію відмитих тромбоцитів у концентрації  $2 \times 10^5$  на 1мкл. активність оксиду азоту синтази визначають у нмоль/хв /  $10^7$  тромбоцитів утвореного формазау.

Прийчинно-наслідковий зв'язок між сукупністю ознак, що заявляються, та технічним результатом полягає в наступному: у пропонованому способі як біологічний матеріал використовують тромбоцити, що так як і ендотеліальні клітини мають оксиду азоту синтазу, аналогічну за біохімічними та антигенними властивостями, що робить їх зручним об'єктом для аналізу стану синтезу оксиду азоту в організмі. Використання тромбоцитів для аналізу активності синтезу оксиду азоту дозволяє уникнути ряду труднощів, що виникали при використанні ендотеліальних клітин. Застосування тромбоцитів замість клітин ендотеліа дозволяє проводити оцінку стану активності оксиду азоту синтази в живому організмі, і що важливо, без порушення його цілісності. Процес виділення і підготовки тромбоцитів для аналізу дозволяє виключити ряд процедур, що можуть вплинути на показники активності оксиду азоту синтази, але є необхідні для одержання і підготовки біологічного матеріалу, що містить ендотеліальні клітини. Зважаючи на вищевказане, тромбоцити як біологічний матеріал більш підходить для аналізу активності оксиду азоту синтази через те, що показники активності оксиду азоту синтази будуть більш достовірними і більш точно відображатимуть процеси, що відбуваються в організмі. Використання тромбоцитів дозволяє застосувати пропонований спосіб оцінки активності оксиду азоту синтази в клінічних умовах, тому що він дозволяє проводити оцінку активності оксиду азоту синтази у при проведенні функціональних проб та лікуванні, як у нормі, так і при виникненні патологічних процесів. Оцінка активності оксиду азоту синтази здійснюється шляхом визначення кількості формазау в нмоль/хв /  $10^7$  тромбоцитів, що дозволяє перейти з напівкількісного визначення і відображення активності фермента в умовних одиницях, до точного кількісного визначення. В цілому запропонований спосіб визначення оксиду азоту синтази дозволяє значно підвищити точність, достовірності та відтворюваність результатів дослідження активності оксиду азоту синтази.

Для визначення показника норми було обстежено 65 чоловік, із них 33 практично здорових осіб, 32 хворих на гіпертонічну хворобу. Серед обстежених здорових осіб були представлені різні вікові групи (згідно рекомендацій ВООЗ), середній вік склав  $40,9 \pm 11,2$  років, жінок було 30 (46,2%), чоловіків - 35 (53,8%). Після обчислення результатів обстеження групи здорових осіб активність оксиду азоту синтази склала  $30,22 \pm 1,65$  нмоль формазау / хв /  $2 \times 10^7$  тромбоцитів з коливанням в межах  $22,6 \pm 1,48$  -  $33,44 \pm 1,87$  нмоль формазау / хв /  $2 \times 10^7$  тромбоцитів. Зазначені показники можуть служити межею норми рівня концентрації кінцевих метаболітів оксиду азоту в плазмі крові. У групі хворих на гіпертонічну хворобу активність оксиду азоту синтази склала  $20,12 \pm 1,25$  нмоль формазау / хв /  $2 \times 10^7$  тромбоцитів.

Спосіб здійснюють таким чином:

1. Виділяють тромбоцити стандартним способом, прийнятим при дослідженні процесів гемостазу.
2. Відмивають тромбоцити стандартним способом.
3. Кінцеву концентрацію тромбоцитів у суспензії доводять до  $2 \times 10^5$  у 1мкл.
4. Суспензію тромбоцитів змішують з холодним ( $4^\circ\text{C}$ ) 4% розчином параформальдегіду.
5. Отриману суміш інкубують 30хв при температурі  $4^\circ\text{C}$ .
4. Після інкубації суспензію тромбоцитів змішують з розчином нітросинього тетразоліа на Трис-НCl буфері (pH7,6), що містить хлорид калію, хлорид кальцію, хлорид магнію, нікотинамід-аденін-динуклеотид-фосфат-відновлений.
6. Інкують 30 хвилин при  $37^\circ\text{C}$ .
7. Кількість формазау визначають по оптичній щільності розчину за допомогою спектроколориметра стандартним способом.
8. Для визначення активності оксиду азоту синтази проводять стандартні арифметичні підрахунки прийняті при кінетичних дослідженнях.
9. Активність оксиду азоту синтази оцінювали в нмоль / хв /  $10^7$  тромбоцитів утвореного формазау.

Приклад: Хворий С. 43 років надійшов у кардіологічне відділення Запорізької обласної клінічної лікарні з скаргами на запаморочення, головний біль, "мільтішиння цяток" перед очима, дзвін у вухах, задишку при фізичному навантаженні. Вважає собі хворим протягом 8 років, коли вперше, без видимої заподій, було зареєстровано носову кровотечу, яка супроводжувалася підвищенням артеріального тиску до 190 та 120мм рт ст. Згодом хворий неодноразово знаходився на стаціонарному лікуванні з приводу гіпертонічної хвороби, одержував

амбулаторну терапію  $\beta$ -блокаторами і діуретиками. За тиждень до надходження в клініку, після сильного психоемоційного потрясіння, з'явилися вищезазначені скарги на тлі високих цифр артеріального тиску (до 180 і 110мм рт ст), і хворий був госпіталізований для купірування гіпертонічного кризу та корекції проводимої терапії. Анамнез життя - без особливостей, мати хворого страждала гіпертонічною хворобою, іншої спадкової патології в родині не виявлено. Пацієнт палить протягом 13 років, інші шкідливі звички заперечує, алергологічний анамнез не обтяжений. Об'єктивно спостерігаються наступні зміни. Артеріальний тиск у момент надходження 180 і 100мм рт ст на лівій і 185 і 110мм рт ст на правій плечових артеріях, пульс 84 ударів у хвилину, задовільних властивостей. При пальпації верхівний поштовх визначається на 2-2,5 див зовні від середньоключичної лінії з лівої сторони в 6 міжребер'ї, поширений збільшений по висоті, посиленний. Перкуторно - розширення границь відносної серцевої тупості, аускультативно - діяльність серця правильна, посиленний I тон на верхівці серця, у легенях дихання везикулярне, жорсткувате, у нижніх відділах з обох боків одиничні вологі дрібно бульбасті неконсонуючі хрипи. Частота дихання 20 у 1 хвилину, дихання поверхневе. На електрокардіограмі - ознаки гіпертрофії міокарда лівого шлуночка, порушення процесів реполяризації в лівих грудних відведеннях. При ехокардіографічному дослідженні спостерігається збільшення кінцеводіастолічного і кінцевосістолічного об'ємів лівого шлуночка, помірне зниження його скорочувальних властивостей, потовщення задньої стінки лівого шлуночка та міжшлуночкової перетинки, наявна гіпертрофія міокарда лівого шлуночка (індекс маси міокарда лівого шлуночка  $123\text{г/м}^3$ ). При рентгенологічному дослідженні в легенях посилений судинний малюнок, корені структурні, тяжисті, більше з правої сторони. При дослідженні очного дна визначається звуження і склерозування артерій, вени повнокровні поширені, феномен Салюса-Гуна II-III ступеня. Дані інших інструментальних та лабораторних досліджень без особливостей. Враховуючи скарги хворого, клінічну картину захворювання, дані об'єктивного дослідження і зважаючи на результати додаткових способів дослідження, хворому був поставлений клінічний діагноз - Гіпертонічна хвороба, II стадія. Враховуючи тяжкість захворювання, необхідність диференціальної діагностики з вторинними формами

симптоматичних артеріальних гіпертензій, а також враховуючи часту асоціацію порушення активності оксиду азоту синтази з підвищенням артеріального тиску, у хворого було проведено оцінку активності оксиду азоту синтази загальновідомим способом. З цією метою хворому була проведена підшкірно-жирова біопсія для одержання артеріальних судин у відповідності з загальноприйнятим методом. Результати оцінки активності оксиду азоту синтази показали, що отримані дані відповідають даним практично здорових осіб, що скоріше пояснюється дією інших ферментів здатних відновлювати нітросиній тетразолій. Тому у хворого була проведена оцінка активності оксиду азоту синтази у відповідності зі способом, що пропонується. Активність оксиду азоту синтази склала  $20,12 \pm 1,25 \text{ нМоль формазана/хв} / 2 \times 10^7$  тромбоцитів, що свідчить про порушення активності оксиду азоту синтази у хворого. Через 12 тижнів комплексного лікування, яку включало додаткове застосування лікарських засобів, що зменшують ендотеліальну дисфункцію, при контрольному обстеженні поряд з поліпшенням клінічної картини захворювання та позитивною динамікою даних інструментальних досліджень, спостерігалось достовірне збільшення активності оксиду азоту синтази яка на кінець курсу терапії склала  $25,13 \pm 1,38 \text{ нМоль формазана} / \text{хв} / 2 \times 10^7$  тромбоцитів. Таким чином, використання способу, що пропонується, дозволило вчасно визначити низький рівень активності оксиду азоту синтази, та призначити патогенетично зумовлену терапію, що в підсумку призвело до підвищення якості діагностики, дозволило оптимізувати лікування і відвернути появу ускладнень.