

Винахід стосується медицини, а саме лабораторної діагностики і може бути використаний для визначення впливу хімічних сполук на продукцію оксиду азоту ендотеліальною ізоформою оксиду азоту синтази.

Ендотеліальна ізоформа оксиду азоту синтази, що міститься в ендотеліальних клітинах, є основним джерелом утворення оксиду азоту в серцево-судинній системі. В умовах норми, ендотеліальна ізоформа оксиду азоту синтази утворює достатню кількість оксиду азоту необхідну для підтримання фізіологічних процесів вазорелаксації судин. Однак, при розвитку патологічних процесів, які спостерігаються при багатьох захворюваннях серцево-судинній системі відбувається порушення процесів синтезу оксиду азоту. При розвитку патологічних процесів кількість оксиду азоту, що синтезує ендотеліальна ізоформа оксиду азоту синтази, є недостатньою для підтримання фізіологічних процесів вазорелаксації судин в організмі людини. Ці порушення являється однією з важливих причин розвитку захворювань серцево-судинної системи, тому важливо застосування методів які допоможуть не тільки нормалізувати та підвищити синтез оксиду азоту ендотеліальною ізоформою оксиду азоту синтази, а також простежити динаміку зміни синтезу оксиду азоту в організмі людини. Це дозволить з високою точністю і вірогідністю судити про утворення оксиду азоту ендотеліальною ізоформою оксиду азоту синтази в організмі людини, що допоможе призначити адекватну терапію, яка призведе до покращення стану хворих з серцево-судинними захворюваннями.

Відомий спосіб визначення впливу хімічних сполук на продукцію оксиду азоту ендотеліальною ізоформою оксиду азоту синтази, що полягає в наступному:

1. Забивають лабораторну тварину - пацюка.
2. Після забою лабораторної тварини відпрепаровують артеріальні судини.
3. Фрагмент артеріальної судини монтують у механотроні, таким чином, щоб судина прийняла таку довжину, яку вона мала в прижиттєвих умовах.
4. Фрагмент артеріальної судини перфузують оксигенованим буферним розчином, створюючи внутрішньоартеріальний тиск у 30мм рт.ст.
5. Вимірюють діаметр артеріальної судини стандартним способом.
6. В середину просвіту артеріальної судини вводять хімічну сполуку, яка впливає на синтез оксиду азоту - ацетилхолін.
7. Вимірюють діаметр артеріальної судини після введення хімічної сполуки, що впливає на синтез оксиду азоту стандартним способом.
8. Вплив хімічної сполуки на продукцію оксиду азоту ендотеліальною ізоформою оксиду азоту синтази визначають за ступенем збільшення діаметра судини у відповідь на застосування хімічної сполуки, яка впливає на синтез оксиду азоту. (Varin R., Mulder P., Richard V. et al. Exercise improves flow-mediated vasodilatation of skeletal muscle arteries in rats with chronic heart failure //Circulation. -1999. -Vol.99. -P.2951-2957).

Спільними суттєвими ознаками прототипу і способу, що заявляється є:

1. Введення хімічної сполуки, яка впливає на синтез оксиду азоту.

Однак, при використанні цього способу визначення впливу хімічних сполук на продукцію оксиду азоту ендотеліальною ізоформою оксиду азоту синтази, широко застосовуються методи гострого експерименту. Важливою характеристикою цих методів є те, що для одержання біологічного матеріалу, який містить ендотеліальну ізоформу оксиду азоту синтази можливо з використанням матеріалу, отриманого в короткий проміжок часу після забою досліджуваної тварини, що робить цей спосіб отримання біологічного матеріалу неможливим для використання в клінічних дослідженнях. Одержання біологічного матеріалу за допомогою біопсії, дозволяє використовувати цей спосіб в клінічних дослідженнях, однак проведення біопсії у людини це процес, котрий супроводжується нанесенням пошкоджень, що негативно позначиться на стану здоров'я досліджуваного, та потребує проведення додаткової терапії для зменшення негативного ефекту після проведення біопсії.

Найбільш близьким за сутністю та досягаємим технічним результатом є спосіб визначення впливу хімічних сполук на продукцію оксиду азоту ендотеліальною ізоформою оксиду азоту синтази, що полягає в наступному:

1. Забирають кров та одержують плазму крові стандартним способом.
2. У плазмі крові визначають вміст нітрозотіолів - маркеру утворення оксиду азоту стандартним способом.
3. В досліджуємий організм вводять хімічну сполуку, яка впливає на синтез оксиду азоту - L-аргінін.
4. Забирають кров та вдруге одержують плазму крові стандартним способом.
5. У плазмі крові вдруге визначають вміст нітрозотіолів - маркеру утворення оксиду азоту стандартним способом.
6. Вплив хімічної сполуки на продукцію оксиду азоту ендотеліальною ізоформою оксиду азоту синтази визначають шляхом обчислення різниці між показником концентрації нітрозотіолів до і після введення хімічної сполуки. (Clarkson P., Adams M.R., Powe A.J. et al. Oral L-arginine improves endothelium-dependent dilation in hypercholesterolemic young adults //J. Clin. Invest. -1996. -Vol.97, №8. -P.1989-1994).

Спільними суттєвими ознаками прототипу і способу, що заявляється є:

1. Введення хімічної сполуки, яка впливає на синтез оксиду азоту.
2. Проведення лабораторного дослідження плазми крові до і після введення хімічної сполуки, яка впливає на синтез оксиду азоту.
3. Визначення в плазмі крові маркера утворення оксиду азоту.

Незважаючи на те, що таким способом можливо визначення впливу хімічних сполук на продукцію оксиду азоту ендотеліальною ізоформою оксиду азоту синтази в організмі, однак використання нітрозотіолів, як маркера утворення оксиду азоту дає приблизні дані про його вміст в організмі людини. Оксид азоту у фізіологічних умовах практично не вступає в реакцію з тілами і, відповідно, не утворює нітрозотіолів. Утворення нітрозотіолів відбувається через проміжні реакції тіолів з редокс формою оксиду азоту - нитрозоній катіоном або з високореактивними метаболітами оксиду азоту, що утворюються в ході метаболізму оксиду азоту. Нітрозотіолі являють собою сполуки, які у фізіологічних умовах нестабільні і легко руйнуються. Процедура кількісного визначення нітрозотіолів, також може вносити помилки в ході визначення, тому що на кожному етапі визначення буде відбуватися значена втрата нітрозотіолів в наслідок їх нестабільної структури та руйнування.

В основу винаходу поставлена задача удосконалення способу визначення впливу хімічних сполук на продукцію оксиду азоту ендотеліальною ізоформою оксиду азоту синтази, шляхом використання іншого маркера утворення оксиду азоту з метою підвищення точності, вірогідності і відтворюваності результатів дослідження.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі визначення впливу хімічних сполук на продукцію оксиду азоту ендотеліальною ізоформою оксиду азоту синтази, що полягає у введенні хімічної сполуки, яка впливає на

синтез оксиду азоту, проведенні лабораторного дослідження плазми крові до і після введення хімічної сполуки, яка впливає на синтез оксиду азоту та визначення в плазмі крові маркера утворення оксиду азоту, новим є те, що як маркер утворення оксиду азоту визначають його кінцеві метаболіти як суму нітритів та нітратів, та за їхньою динамікою визначають вплив на продукцію оксиду азоту ендотеліальною ізоформою оксиду азоту синтази.

Прийнятливий зв'язок між сукупністю ознак, що заявляються, та технічним результатом що досягається полягає в наступному: у запропонованому способі визначення впливу хімічних сполук на продукцію оксиду азоту ендотеліальною ізоформою оксиду азоту синтази в якості маркера утворення оксиду азоту використовують визначення кінцевих метаболітів оксиду азоту, як суму нітритів та нітратів. Використання кінцевих метаболітів, як маркера утворення оксиду азоту ендотеліальною ізоформою оксиду азоту синтази, дозволяє уникнути ряд труднощів, які виникали при використанні інших маркерів, за допомогою яких можна було судити про утворення оксиду азоту в організмі. Кінцеві метаболіти - нітрити та нітрати є одними із найбільш стабільних сполук у порівнянні з іншими метаболітами оксиду азоту, тому завдяки своїй хімічній структурі при проведенні процедур аналізу кінцевих метаболітів дозволяє отримати більш точні та достовірні дані. З огляду на вищесказане, використання маркера утворення оксиду азоту, а саме - кінцевих метаболітів, більш підходить для оцінки впливу хімічних сполук які здатні впливати на активність ендотеліальної ізоформи оксиду азоту синтази, тому що визначення кінцевих метаболітів дає більш точні і достовірні дані. Це дозволить більш точно відобразити процеси синтезу оксиду азоту, що протікають в організмі. У цілому запропонований спосіб визначення дозволяє значно підвищити точність, достовірності та відтворюваність результатів дослідження активності синтази оксиду азоту.

Для визначення впливу хімічних сполук на продукцію оксиду азоту ендотеліальною ізоформою оксиду азоту синтази було обстежено 45 чоловік до і після введення хімічної сполуки, яка впливає на синтез оксиду азоту - ацетилхоліну. У обстежених осіб до введення хімічної сполуки, яка впливає на синтез оксиду азоту - ацетилхоліну концентрація кінцевих метаболітів оксиду азоту складала $22,4 \pm 1,8$ мкмоль/л. Після введення хімічної сполуки, яка впливає на синтез оксиду азоту-ацетилхоліну концентрація кінцевих метаболітів оксиду азоту складала $24,2 \pm 1,3$ мкмоль/л, тобто у 100% обстежених осіб спостерігали збільшення продукції оксиду азоту.

Спосіб здійснюють таким чином:

1. У досліджуваних осіб здійснюється збір крові стандартним способом.
2. Одержують плазму крові стандартним способом.
3. В плазмі крові проводять визначення кінцевих метаболітів, як суму нітритів та нітратів стандартним способом.
4. В досліджуємі організм вводять хімічну сполуку, яка впливає на продукцію оксиду азоту.
5. У досліджуваних осіб здійснюється повторний збір крові стандартним способом.
6. Одержують плазму крові стандартним способом.
7. В плазмі крові проводять визначення кінцевих метаболітів, як суму нітритів та нітратів стандартним способом.
8. Вплив хімічної сполуки на продукцію оксиду азоту ендотеліальною ізоформою оксиду азоту синтази визначають по динаміці між показником концентрації кінцевих метаболітів до і після введення хімічної сполуки, яка впливає на утворення оксиду азоту.

Приклад

Хворий С. 43 років надійшов у кардіологічне відділення Запорізької обласної клінічної лікарні з скаргами на запаморочення, головний біль, "мільтишиння 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 120 мм рт.ст. Згодом хворий неодноразово знаходився на стаціонарному лікуванні з приводу гіпертонічної хвороби, одержував амбулаторну терапію β -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 110 мм 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 палив протягом 13 років, інші шкідливі звички заперечує, алергологічний анамнез не обтяжений. Об'єктивно спостерігаються наступні зміни. Артеріальний тиск у момент надходження 180 і 100 мм рт.ст на лівій і 185 і 110 мм 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, посилений. Перкуторно-розширення границь відносної серцевої тупості, аускультативно - діяльність серця правильна, посилений I тон на верхівці серця, у легенях дихання везикулярне, жорсткувате, у нижніх відділах з обох боків одиничні вологі дрібнобульбасті 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 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 часту асоціацію порушення активності оксиду азоту синтази та підвищення артеріального тиску, з метою оптимізації застосовуємої протигіпертензивної терапії, хворому був призначений препарат еналаприл. Відповідно до способу, що пропонується була проведена оцінка впливу препарату еналаприл на продукцію оксиду азоту ендотеліальною ізоформою оксиду азоту синтази. У досліджуваного перед застосуванням препарату еналаприл, рівень кінцевих метаболітів в плазмі крові склав $15,4$ мкмоль/л, після застосування препарату еналаприл рівень кінцевих метаболітів склав $18,6$ мкмоль/л. Отримані дані свідчать про достовірне підвищення синтезу оксиду азоту ендотеліальною ізоформою оксиду азоту синтази в середньому в 1,2 рази. Таким чином, використання способу, що пропонується, дозволило визначити вплив хімічної сполуки на продукцію оксиду азоту ендотеліальною ізоформою оксиду азоту синтази та

обґрунтувати доцільність введення еналаприла патогенетичнообґрунтованого лікарського засобу у даного пацієнта.