

Винахід стосується медицини, а саме лабораторної діагностики і може бути використаний для оцінки активності оксиду азоту синтази фагоцитуючих клітин при захворюваннях внутрішніх органів.

Важливість визначення активності оксиду азоту синтази, ґрунтується на тому, що цей фермент є єдиним ендogenous джерелом утворення оксиду азоту в організмі людини. Значна фізіологічна активність оксиду азоту як основного регулятора тонусу судин, важливого месенджера в центральній нервовій системі, імуномодулятора, здатного до того ж до окислювально-відновлювальних реакцій, вказує на необхідність точної оцінки його метаболізму в організмі людини при різних патологічних станах. Оцінка окремих етапів метаболізму оксиду азоту і, насамперед, інтенсивності його продукції в організмі, дозволить точно встановити причину гіпопродукції або гіперпродукції цієї молекули. Здатність до експресії хоча б однієї з трьох відомих ізоформ оксиду азоту синтази, показана майже для всіх клітин організму людини, однак, основними продуцентами оксиду азоту поряд з ендотеліоцитами є фагоцитуючі клітини.

Відомий спосіб оцінки активності оксиду азоту синтази фагоцитуючих клітин, що полягає у наступному:

1. Готують парафіновий зріз багатой нейтрофілами тканини після формалінової фіксації, стандартним способом.

2. Зріз депарафінують стандартним способом.

3. Інкують зріз в 1% перекису водню у 0,25% розчині Тритону X-100 впродовж 15 хвилин при кімнатній температурі.

4. Зріз відмивають стандартним способом і інкують у 1% розчині сироватки крові свині впродовж 30 хвилин.

5. Видаляють рідину над зрізом та інкують його у розчині кролячих антитіл проти мишиної індукційної ізоформи оксиду азоту синтази у вологій камері впродовж ночі при 4°C.

6. Зріз промивають і видаляють рідину над зрізом стандартним способом.

7. Інкують зріз з розчином біотинілізованих козячих антитіл проти кролячих імуноглобулінів впродовж 30 хвилин при кімнатній температурі.

8. Зріз промивають і видаляють рідину над зрізом стандартним способом.

9. Інкують зріз у розчині авідін-пероксидази впродовж 30 хвилин при кімнатній температурі стандартним способом.

10. Зріз промивають і видаляють рідину над зрізом стандартним способом.

11. Виявляють пероксидазо-позитивні ділянки на зрізі інкуючи його в розчині діамінобензидіну з дофарбуванням гематоксиліном стандартним способом.

12. Активність оксиду азоту синтази оцінюють за допомогою світлового мікроскопу за інтенсивністю пероксидазного забарвлення нейтрофілів у зрізі, вираженого в умовних одиницях.

(Sandhu J. K., Wenckebach G., Bimboim H.C. Neutrophils, nitric oxide synthase, and mutations in the mutatest murine tumor model. // Am. J. Pathology, - 2000. - Vol. 156. - P.509-518.)

Суттєвими ознаками аналогу і винаходу, що збігаються є такі:

1. Проведення лабораторного дослідження.

Не зменшуючи значення вказаного способу для оцінки активності оксиду азоту синтази фагоцитуючих клітин, слід зауважити, що процедура підготовки зразка до аналізу є надто тривалою і багатоетапною. Представлений імуногістохімічний спосіб оцінки активності оксиду азоту синтази фагоцитуючих клітин непрямо дає уяву про активність ферменту. Застосування антитіл проти індукційної ізоформи оксиду азоту синтази у вказаному способі, дає уяву лише про рівень експресії даної ізоформи ферменту. При цьому слід зазначити, що рівень експресії будь-якого ферменту, в тому числі і оксиду азоту синтази не завжди пропорційний його активності, що негативно позначається на точності оцінки активності ферменту. Негативний вплив на точність та відтворюваність результатів дослідження посилюється ще й через застосування напівкількісної їх оцінки. Тож, сукупність наведених фактів, а також наявність суб'єктивізму під час проведення обліку результатів дослідження не дає змоги достатньо точно і достовірно оцінити активність оксиду азоту синтази фагоцитуючих клітин вказаним способом.

Найбільш близьким за технічною суттєвістю та досягаємим результатом є спосіб оцінки активності оксиду азоту синтази фагоцитуючих клітин, що полягає у наступному:

1. Отримують перитонеальні макрофаги стандартним способом.

2. Суспензію макрофагів кількістю  $2 \times 10^5$  у 200мкл середовища RPMI-1640 з 10мМ HEPES, 2мМ L-глутаміну, 80мг/л гентаміцину і 5% ембріональною сироваткою телят вносять до лунки 96-луночного планшету.

3. Інкують суспензію впродовж доби при 37°C в атмосфері 5% CO<sub>2</sub> стандартним способом.

4. Переносять 100мкл інкубаційної суміші у вільну лунку 96-луночного планшету, додають реактив Грісу (послідовно 100мкл 1,5%-го розчину сульфаніламідів в 1н. HCL і 100мкл 0,15%-го розчину M-(1-нафтіл)етилендіаміну).

5. Інкують суміш 30 хвилин при кімнатній температурі стандартним способом.

6. Вимірюють оптичну щільність забарвленого розчину при 540нм стандартним способом.

7. За даними калібровочного графіку визначають активність оксиду азоту синтази у мкМ утвореного оксиду азоту на  $10^6$  макрофагів/мл. (Шезбухов Ю.В., Вайсбург М.Ю., Артюшкин К.В., Мысякин Е.Б. Синтез окиси азота перитонеальними макрофагами миши под действием С-реактивного протеина // Бюлл. эксп. биол. и медицины. - 1998. - №1. - С.48-50.)

Суттєвими ознаками прототипу і винаходу, що збігаються, є такі:

1. Виділення фагоцитуючих клітин.

2. Додавання до інкубаційної суміші реактиву Грісу.

3. Визначення вмісту кінцевих метаболітів оксиду азоту при 540нм.

4. Вираження активності оксиду азоту синтази у перерахунку на  $10^6$  клітин.

Застосування вказаного способу оцінки активності оксиду азоту синтази фагоцитуючих клітин ґрунтується на кількісному визначенні продукції оксиду азоту. Однак слід зауважити, що в даному способі до інкубаційного середовища не додають субстратів і кофакторів необхідних для функціонування оксиду азоту синтази. Тому, зважаючи на тривалий термін інкубації, ферментативна активність ферменту може лімітуватись недостатністю

субстрату, що в підсумку може привести до заниження результатів дослідження. В представленому способі не застосовують також і інгібітори активності оксиду азоту синтази, що було б доцільним для точної і достовірної оцінки ферментативної активності. Крім того необхідно вказати ще й на те, що у вказаному способі відсутній етап конверсії нітрат-іонів у складі інкубаційної суміші до нітрит-іонів. Необхідність і доцільність даного етапу обумовлена тим, що утворюваний оксид азоту швидко метаболізує послідовно до нітрит- і далі до кінцевого метаболіту - нітрат-іону, який не реагує з компонентами реактиву Грісу. Тому, за умов обмеження надходження нітрат-іонів до організму з їжею, основна маса їх, що має ендогенне походження, без етапу конверсії у нітрит-іони, вилучалася б із реакції. Відсутність етапу депротейнізації інкубаційної суміші також може негативно впливати на точність та достовірність визначення концентрації оксиду азоту і далі - активності оксиду азоту синтази, через те, що продукти білкового метаболізму спроможні впливати на оптичну щільність реакційної суміші, яка реєструється при 540нм. Таким чином, відсутність в даному способі окремих етапів, важливих для отримання більш точних результатів, негативно позначається на достовірності і відтворюваності оцінки активності оксиду азоту синтази.

В основу винаходу поставлено задачу удосконалення способу оцінки активності оксиду азоту синтази фагоцитуючих клітин шляхом проведення додаткових етапів у процедурі аналізу, що дозволить підвищити точність, достовірність і відтворюваність результатів дослідження.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі оцінки активності оксиду азоту синтази фагоцитуючих клітин шляхом виділення фагоцитуючих клітин, додавання до інкубаційної суміші реактиву Грісу, визначення вмісту кінцевих метаболітів оксиду азоту при 540нм і вираження активності оксиду азоту синтази у перерахунку на  $10^6$  клітин, НОВИМ є те, що застосовують специфічний субстрат і специфічний інгібітор синтази оксиду азоту, проводять послідовно депротейнізацію інкубаційної суміші і конверсію нітрат-іонів в ній у нітрит-іони і розраховують активність оксиду азоту синтази за формулою:  $E = (C/X \cdot 10^6) / 30$ , де: E - активність оксиду азоту синтази (нМ/ $10^6$ клітин/хвилину), C - концентрація оксиду азоту (нМоль), X - кількість клітин у пробі,  $10^6$ , 30 - коефіцієнти.

Прийнятливо-наслідковий зв'язок між сукупністю ознак, що заявляються, та технічним результатом полягає у наступному: для оцінки активності оксиду азоту синтази фагоцитуючими клітинами визначають продукцію ними оксиду азоту. Відомо, що фагоцитуючі клітини, зокрема нейтрофіли і моноцити, здатні до експресії індукційної ізоформи оксиду азоту синтази. Зважаючи на високий вміст цих клітин у крові і багатьох інших тканинах організму можна говорити про значну питому вагу активності їх оксиду азоту синтази у продукцію оксиду азоту в організмі людини. Визначення активності оксиду азоту синтази фагоцитуючих клітин проводять у суспензії цих клітин, до якої крім необхідного буферного середовища і кофакторів, додають специфічний субстрат - L-аргінін або специфічний інгібітор N-ω-нітро-L-аргінін метіловий ефір. Додавання специфічного субстрату необхідно для повної прояви активності синтази оксиду азоту, яка у протилежному випадку може лімітуватись через недостатність субстрату. Застосування ж специфічного інгібітору дозволяє підвищити точність і особливо відтворюваність результатів оцінки активності оксиду азоту синтази. Так само важливим етапом є конверсія нітрат-іонів у нітрит-іони. Без проведення етапу конверсії, визначається лише рівень нітрит-іонів, що не дає змоги точно і достовірно оцінити продукцію оксиду азоту в організмі людини, через те, що значна частина нітрит-іонів окислюється далі до нітрат-іонів. У зв'язку з цим необхідність проведення конверсії нітрат-іонів до нітрит-іонів за допомогою гранул металевого кадмію обумовлена підвищенням точності, достовірності та відтворюваності результатів дослідження. Таким чином, оцінка активності оксиду азоту синтази фагоцитуючих клітин за продукцією ними оксиду азоту, в умовах застосування модулаторів активності ферменту, з обов'язковим проведенням таких додаткових етапів, як депротейнізація інкубаційної суміші та конверсія нітрат-іонів в ньому до нітрит-іонів, дозволить значно підвищити точність, достовірність та відтворюваність результатів оцінки активності оксиду азоту синтази фагоцитуючих клітин.

Для визначення показника норми нами було обстежено 24 практично здорових осіб, середній вік яких склав  $36,5 \pm 3,4$  років, жінок було 10(41,7%), чоловіків -14(58,3%). Після обчислення результатів обстеження групи здорових осіб, було встановлено, що активність оксиду азоту синтази нейтрофілів становить  $18,2 \pm 1,7$  нМ/ $10^6$ клітин/хв., а активність оксиду азоту синтази моноцитів становить  $20,7 \pm 1,8$  нМ/ $10^6$ клітин/хв.

Спосіб здійснюється таким чином:

1. Отримують стабілізовану гепарином (50д/мл) кров стандартним способом.
2. Кров відстоюють 30 хвилин при кімнатній температурі і відбирають шар плазми крові збагаченої лейкоцитами.
3. Нашаровують плазму крові збагачену лейкоцитами на розчин градієнту щільністю  $1,080 \text{ г/см}^2$ .
4. Розділяють клітини крові на градієнт щільності стандартним способом.
5. Відбирають шар моноцитів над розчином градієнту і осад нейтрофілів під шаром розчину градієнту в окремі пробірки з 3мл фосфатно-сольового буферу (pH-7,4).
6. Відмивають клітини, центрифугуючи суспензію 10 хвилин при 400g, після чого надосадову рідину зливають, а осад клітин суспендують у 3мл фосфатно-сольового буферу (pH-7,4).
7. Суспензії нейтрофілів і моноцитів об'ємом по 3мл розділяють на рівні частини по 1,5мл.
8. Відмивають клітини, центрифугуючи суспензії 7 хвилин при 200g, надосадову рідину зливають.
9. Осад нейтрофілів у 1-й і 2-й пробірках (1-а і 2-га проби) і моноцитів у 1-й і 2-й пробірках (1-а і 2-га проби) суспендують в інкубаційному середовищі такого складу: середовище RPMI-1640 з 5% ембріональною телячою сироваткою і NADPH (кінцева концентрація - 1 мМ) і відмивають суспензії як у п.6.
10. Осад клітин у всіх пробірках суспендують у 200мкл інкубаційного середовища.
11. Оцінюють життєздатність клітин у суспензіях за допомогою 0,1% розчину трипанового синього, стандартним способом.
12. Визначають кількість клітин у 1мкл суспензії за допомогою камери Горяєва, стандартним способом.
13. До 1-ої проби з суспензією нейтрофілів і 1-ї проби з суспензією моноцитів додають 200мкл інкубаційного середовища до складу якого входить 2мМ L-аргініну.
14. До 2-ї проби з суспензією нейтрофілів і 2-ї проби з суспензією моноцитів додають 200мкл інкубаційного середовища до складу якого входить 2мМ N-ω-нітро-L-аргінін метілового ефіру.

15. Суспензії інкубують 30 хвилин при 37°C.

16. До 1-ї і 2-ї проби інкубаційної суміші з суспензією нейтрофілів, а також 1-ї і 2-ї проби інкубаційної суміші з суспензією моноцитів додають розчин сульфату цинку (кінцева концентрація - 0,4%) і розчин гідроксиду натрію (кінцева концентрація - 27,5мМ).

17. Центрифугують суміш 20 хвилин при 800g.

18. Відбирають депротейнізовану над осадову рідину кожної із проб для подальшого аналізу.

19. Готують гранули Cd для конверсії нітрат-іонів депротейнізованої надосадової рідини стандартним способом.

20. До осаду Cd додають послідовно 200мкл депротейнізованої надосадової рідини однієї із проб і 80мкл 0,6М гліцин-гідроксид натрію буферного розчину (pH-9,7).

21. Інкубують реакційну суміш 20 хвилин при кімнатній температурі (22°C).

22. Центрифугують реакційну суміш 1 хвилину при 400g.

23. Відбирають по 200мкл надосадової рідини 1-ої і 2-гої проб нейтрофілів та 1-ої і 2-гої проб моноцитів у окремі лунки 96-луночного планшету.

24. Додають до кожної проби по 100мкл реактиву Грісу.

25. Інкубують реакційну суміш 15 хвилин при кімнатній температурі.

26. Реєструють оптичну щільність реакційної суміші при 540нм, за допомогою фотоелектроколориметричного рідера.

27. Від значення оптичної щільності інкубаційної суміші 1-ої проби нейтрофілів (чи моноцитів) віднімають значення оптичної щільності 2-гої проби.

28. Маючи значення різниці оптичної щільності визначають вміст нітрит-іонів по калібровочній кривій стандартним способом.

29. Розраховують активність оксиду азоту синтази за формулою:

$$E = \left( \frac{C}{X} \times 10^6 \right) / 30$$

де: E - активність оксиду азоту синтази (нМ/10<sup>6</sup> клітин/хвилину);

C - концентрація оксиду азоту (нМоль);

X - кількість клітин у пробі;

10<sup>6</sup>, 30 - коефіцієнти.

Приклад: Хворий Б. 37 років надійшов у алергологічне відділення Запорізької обласної клінічної лікарні зі скаргами на слабкість, спітнілість, головний біль, періодично утруднене дихання експіраторного характеру переважно у нічні години, задуху у спокої та при найменшому фізичному навантаженні, сухий кашель. Вказані ознаки порушення функції дихання з'явилися вперше за два дні до надходження в клініку, після перенесеної гострої респіраторної вірусної інфекції, і хворий був госпіталізований для лікування загострення захворювання. Анамнез життя - без особливостей, спадкової патології в родині не виявлено. Пацієнт не палить, інші шкідливі звички заперечує, алергологічний анамнез не обтяжений. Об'єктивно спостерігаються наступні зміни. При огляді відзначається участь допоміжних м'язів в акті дихання. При пальпації голосове тремтіння дещо послаблене, верхівковий поштовх визначається нечітко. Перкуторно над всією поверхнею легень легеневиий звук, аускультативно - діяльність серця правильна, тони приглушені, в легенях дихання жорстке, велика кількість розсіяних сухих та вологих хрипів, більше у нижніх відділах. Частота дихання 29 за 1 хвилину, дихання поверхневе. Артеріальний тиск у момент надходження 165/90мм.рт.ст., пульс 80 ударів за хвилину, задовільних властивостей. На електрокардіограмі - ознаки гіпертрофії міокарду правого шлуночка, порушення процесів реполяризації в правих грудних відведеннях, неповна блокада правої ніжки пучка Пса. При ехокардіографічному дослідженні спостерігається збільшення порожнини правого шлуночка, потовщення передньої стінки правого шлуночка та міжшлуночкової перетинки, парадоксальний рух міжшлуночкової перетинки у систолу, помірне зниження скоротливих властивостей лівого шлуночка. При рентгенологічному дослідженні: легені без видимих очагово-інфільтративних змін, з посиленням судинним малюнком, корені структурні. Враховуючи скарги хворого, клінічну картину захворювання, наявність високої концентрації кінцевих метаболітів оксиду азоту у конденсаті видихуваного повітря і дані об'єктивного дослідження, виникла необхідність проведення додаткових лабораторних досліджень з метою виявлення причини посилення продукції оксиду азоту у респіраторному тракті. Для цього була проведена оцінка активності оксиду азоту синтази нейтрофілів і моноцитів крові згідно запропонованого способу. Аналіз отриманих результатів показав, що активність синтази оксиду азоту нейтрофілів складала 12,6нМ/10<sup>6</sup> клітин/хв., що було значно менше її значення у практично-здорових осіб. Активність оксиду азоту синтази моноцитів складала 21,7нМ/10<sup>6</sup> клітин/хв і було дещо вище її значення в нормі. Таким чином біло встановлено, що серед фагоцитуючих клітин саме активністю оксиду азоту синтази моноцитів обумовлено посилення продукції оксиду азоту у респіраторному тракті. Таким чином, використання способу, що пропонується, дозволяє точно оцінити і достовірно оцінити активність оксиду азоту синтази фагоцитуючих клітин і встановити причину змін метаболізму оксиду азоту в організмі в умовах запалення.