



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 48857

(13) A

(51) 6 G01N21/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ АКТИВНОСТІ СИНТЕТАЗИ ОКСИДУ АЗОТУ

1

2

(21) 2002010267

(22) 10 01 2002

(24) 15 08 2002

(46) 15 08 2002, Бюл. № 8, 2002 р.

(72) Поливода Сергій Миколайович, Черепок
Олександр Олексійович, Тищенко Максим Воло-
димирович, Войтович Олександр Васильович(73) ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ, Поливода Сергій Миколайович,
Черепок Олександр Олексійович, Тищенко Максим
Володимирович, Войтович Олександр Васильович(57) Спосіб оцінки активності синтетази оксиду
азоту, що включає одержання біологічного

матеріалу, що містить клітини, які є джерелом син-
тетази оксиду азоту, фіксацію біологічного
матеріалу в 4% розчині параформальдеїду,
інкубацію в розчині, що містить нітросиній
тетразолій і нікотинамід-аденін-динуклеотид-
фосфат-відновлений, та визначення кількості
формагану, який відрізняється тим, що як
біологічний матеріал використовують суспензію
відмитих тромбоцитів у концентрації 2×10^5 на 1
мкл, активність синтетази оксиду азоту визнача-
ють по кількості формагану на 10^5 тромбоцитів

Винахід стосується медицини, а саме лабора-
торної діагностики і може бути використаний для
оцінки активності синтетази оксиду азоту у хворих
із захворюваннями внутрішніх органів

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

Відомий спосіб оцінки активності синтетази ок-
сиду азоту, що полягає в наступному

1. Отримують артеріальні судини, що містять
ендотеліальні клітини, які є джерелом синтетази
оксиду азоту, безпосередньо після убою лабора-
торних тварин

2. Фіксують артеріальні судини у 4% розчині
параформальдеїду протягом 1 години

3. Виготовляють мікропрепарати артеріальних
судин стандартним способом

4. Інкують отримані мікропрепарати в бу-
ферному розчині, що містить 0,3% Тритону X-100,
0,1мг/мл нітросинього тетразолію, 1мг/мл нікотина-
мід-аденін-динуклеотид-фосфату-відновленого
протягом 1 години в темноті

5. Зупиняють реакцію, додаючи 70% етанол

6. Активність синтетази оксиду азоту, оціню-
ють 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 і винаходу, що
збігаються, є такі

1. Одержання біологічного матеріалу, що мі-
стить клітини, які є джерелом синтетази оксиду азо-
ту

2. Фіксація біологічного матеріалу у 4% розчині
параформальдеїду

3. Інкубація в розчині, що містить нітросиній
тетразолій і нікотинамід-аденін-динуклеотид-
фосфат-відновлений

Однак, при використанні цього способу визна-
чення активності синтетази оксиду азоту, одер-
жання біологічного матеріалу, що містить ендоте-
ліальні клітини можливо тільки з трупного або

(13) A

(11) 48857

(19) UA

біопсійного матеріалу. Отримання матеріалу вказаним способом і наступні процедури пов'язані з підготовкою зразків для дослідження, можуть негативно вплинути на показники активності синтетази оксиду азоту. 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 синтетази оксиду азоту у хворих при різних патологічних станах. До того ж оцінка активності синтетази оксиду азоту проводиться напівкількісним способом. Цей спосіб хоч і дозволяє принципово оцінити активність синтетази оксиду азоту, однак точність і достовірність отриманих даних буде досить низькою.

Найбільш близьким за технічною сутністю та досягаемым результатом є спосіб оцінки активності синтетази оксиду азоту, що полягає в наступному:

- 1 Одержують артеріальні судини, що містять ендотеліальні клітини, які є джерелом синтетази оксиду азоту, безпосередньо після убою лабораторних тварин.

- 2 Виготовляють мікропрепарати артеріальних судин стандартним способом, використовуючи кріотом.

- 3 Фіксують отримані мікропрепарати у 4% розчині параформальдегіду протягом 30 хвилин.

- 4 Інкують отримані мікропрепарати в буферному розчині, що містить 0,2% Тритону X-100 протягом 30 хвилин.

- 5 Інкують мікропрепарати в розчині, що містить 0,2 ммоль/л нітросинього тетразолію, 1 ммоль/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.

- 8 Визначають кількість формазану за допомогою комп'ютерної системи аналізу зображення в умовних одиницях на одну клітину.

- 9 Оцінку активності синтетази оксиду азоту визначають по кількості гранул формазану на ендотеліальну клітину.

(Channon K M., Qian H., Neplicueva 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 клітки, які є джерелом синтетази оксиду азоту.

- 2 Фіксація біологічного матеріалу в 4% розчині параформальдегіду.

- 3 Інкубація в розчині, що містить нітросиній тетразолій і нікотинамід-аденін-динуклеотид-фосфат-відновлений.

- 4 Визначення кількості формазану.

Незважаючи на те, що таким способом можливо визначати активність синтетази оксиду азоту, однак одержання біологічного матеріалу, який є

джерелом синтетази оксиду азоту незручний, не тільки тому, що порушує цілісність організму, та й тим, що отримання таким способом біологічного матеріалу, може привести до зміни показників активності синтетази оксиду азоту, що негативно відобразиться на точності і достовірності отриманих даних. Крім цього оцінка кількості формазану проводиться напівкількісним методом і отримані данні представлені в умовних одиницях. Аналіз отриманих результатів дає лише приблизні дані про активність синтетази оксиду азоту. Застосування мікроскопа 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 формазану, 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 синтетази оксиду азоту шляхом використання іншого біологічного матеріалу для дослідження зміни методики визначення кількості формазану, що забезпечить підвищення достовірності, точності і відтворюваності результатів дослідження.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі оцінки активності синтетази оксиду азоту, що полягає в одержанні біологічного матеріалу, що містить клітини, які є джерелом синтетази оксиду азоту, фіксації біологічного матеріалу в 4% розчині параформальдегіду, інкубації в розчині, що містить нітросиній тетразолій і нікотинамід-аденін-динуклеотид-фосфат-відновлений, та визначення кількості формазану, новим є те, що як біологічний матеріал використовують суспензію відмитих тромбоцитів у концентрації $2 \cdot 10^5$ на 1 мкл, активність синтетази оксиду азоту визначають по кількості формазану на 10^4 тромбоцитів.

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю ознак, що заявляються, та технічним результатом полягає в наступному: у пропонованому способі як біологічний матеріал використовували тромбоцити, що так як і ендотеліальні клітини мають синтетазу оксиду азоту, 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 ендотелію дозволяє проводити оцінку стану активності синтетази оксиду азоту 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 синтетази оксиду азоту, 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 синтетази оксиду азоту через те, що показники активності синтетази оксиду азоту будуть більш достовірними і більш

точно відображатимуть процеси, що відбуваються в організмі. Використання тромбоцитів дозволяє застосувати запропонований спосіб оцінки активності синтетази оксиду азоту в клінічних умовах, тому що він дозволяє проводити оцінку активності синтетази оксиду азоту у при проведенні функціональних проб та лікуванні, як у нормі, так і при виникненні патологічних процесів. Оцінка активності синтетази оксиду азоту здійснюється шляхом визначення кількості формазану на 10^7 тромбоцитів, що дозволяє перейти з напівкількісного визначення і відображення активності ферменту в умовних одиницях, до точного кількісного визначення. В цілому запропонований спосіб визначення синтетази оксиду азоту дозволяє значно підвищити точність, достовірності та відтворюваність результатів дослідження активності синтетази оксиду азоту. Спосіб здійснюють таким чином:

1 Виділення тромбоцитів роблять стандартним способом, прийнятим при дослідженні процесів гемостазу

2 Відмивання тромбоцитів роблять загально-відомим способом

3 Кінцеву концентрацію тромбоцитів у суспензії доводять до $2 \cdot 10^5$ у 1 мкл

4 Суспензію тромбоцитів змішують з холодним (4°C) 4% розчином параформальдегіду

5 Отриману суміш інкубують 10 - 15 хв при температурі 4°C

6 Після інкубації суспензію тромбоцитів змішують з розчином нитросинього тетразолію на Трис-НСІ буфері (рН 7,6), що містить хлорид калію, хлорид кальцію, хлорид магнію, нікотинамід-аденін-динуклеотид-фосфат-відновлений

7 Інкубують 30 хвилин при 37°C

8 Визначення кількості формазану здійснюють стандартним способом

9 Оцінку активності синтетази оксиду азоту проводять по кількості формазану в нг на 10^7 тромбоцитів

Приклад. Хворий С. 43 років надійшов у кардіологічне відділення Запорізької обласної клінічної лікарні з скаргами на запаморочення, головний біль, "мільтішіння цятки" перед очима, дзвін у вухах, задишку при фізичному навантаженні. Вважає себе хворим протягом 8 років, коли вперше, без видимої заповіді, 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'явився вищезазначений скарги на тлі високих цифр артеріального тиску (до 180 і 110 мм рт.ст.), 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 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 міжребір'ях, поширений, збільшений по висоті, посилений. Перкуторно - розширення границь відносно серцевої тупості, аускультативно - діяльність серця правильна, посилений І 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 кінцевого діастолічного і кінцевого систолічного 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 тяжкість захворювання, необхідність диференціальної діагностики з вторинними формами симптоматичних артеріальних гіпертензій, а також враховуючи часту асоціацію порушення функції синтетази оксиду азоту з підвищенням артеріального тиску, у хворого було проведено оцінку активності синтетази оксиду азоту загально-відомим способом. З цією метою хворому була проведена підшкірно-жирова біопсія для одержання артеріальних судин у відповідності з загальноприйнятим методом. Отримували артеріальні судини, що містять ендотеліальні клітини, які є джерелом синтетази оксиду азоту, безпосередньо після убою лабораторних тварин. Фіксували артеріальні судини у 4% розчині параформальдегіду протягом 1 години. Виготовляли мікропрепарати артеріальних судин стандартним способом. Інкубували отримані мікропрепарати в буферному розчині, що містить 0,3% Тритона X-100, 0,1 мг/мл нитросинього тетразолію, 1 мг/л нікотинамід-аденін-динуклеотид-фосфату-відновленого протягом 1 години в темноті. Активність синтетази оксиду азоту, оцінювали за ступенем зміни забарвлення ендотеліальних клітин. Результати оцінки синтетази оксиду азоту показали, що отримані дані відповідають практично здоровим особам, що скоріше пояснюється дією інших ферментів здатних відновлювати нитросиній тетразолій. Тому у хворого була проведена оцінка активності синтетази оксиду азоту у відповідності з запропонованим способом. Виділення тромбоцитів робили стандартним способом, прийнятим при дослідженні процесів гемостазу. Відмивання тром-

боцитів робили загальноприйнятим способом. Кінцеву концентрацію тромбоцитів у суспензії доводили до $2 \cdot 10^5$ у 1мкл. Суспензію тромбоцитів змішували з холодним (4°C) 4% розчином параформальдегіда. Отриману суміш інкубували 10 - 15хв при температурі 4°C . Після інкубації суспензію тромбоцитів змішували з розчином нітросинього тетразолію на Трис-НСІ буфері (рН 7,6), що містить хлорид калію, хлорид кальцію, хлорид магнію, шкотинамід-аденін-динуклеотид-фосфат-відновлений. Інкубували 30 хвилин при 37°C . Визначення кількості формазану здійснювали стандартним способом. Оцінку активності синтетази оксиду азоту визначають за кількістю формазану в нг на 10^7 тромбоцитів. Отриманні результати оцінки синтетази оксиду азоту склали $270,12 \pm 10,45$ нг формазану на $2 \cdot 10^7$ тромбоцитів. 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 синтетази оксиду азоту яку на кінець курсу терапії склало $305,23 \pm 11,68$ нг формазану на $2 \cdot 10^7$ тромбоцитів. Таким чином, використання способу, що пропонується, дозволило вчасно визначити низький рівень активності синтетази оксиду азоту, та призначити патогенетично зумовлену терапію, що в підсумку призвело до підвищення якості діагностики, дозволило оптимізувати лікування і відвернути появу ускладнень.

ДП «Український інститут промислової власності» (Укрпатент)

вул. Сим'ї Хохлових, 15, м. Київ, 04119, Україна

(044) 456 – 20 – 90

ТОВ «Міжнародний науковий комітет»

вул. Артема, 77, м. Київ, 04050, Україна

(044) 216 – 32 – 71