



УКРАЇНА

(19) UA (11) 57878 (13) U
(51) МПК (2011.01)
G01N 33/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ІНДУЦЕБЕЛЬНОЇ NO-СИНТАЗНОЇ СИСТЕМИ У ХВОРИХ З СЕРЦЕВО-СУДИННОЮ ПАТОЛОГІЄЮ

1

(21) u201011861

(22) 06.10.2010

(24) 10.03.2011

(46) 10.03.2011, Бюл.№ 5, 2011 р.

(72) МХІТАРЯН ЛАУРА СОКРАТИВНА, ЄВСТРАТОВА ІРИНА НИКИФОРІВНА, ЯКУШКО ЛЮДМИЛА ВАСИЛІВНА, ЛІПКАН НАІРА ГЕОРГІЇВНА, ГАВРИЛЕНКО ТЕТЯНА ІЛЛІВНА

(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР "ІНСТИТУТ КАРДІОЛОГІЇ ІМЕНІ АКАДЕМІКА М.Д. СТРАЖЕСКА" АМН УКРАЇНИ

(57) Спосіб визначення характеристики стану індуцельної NO-синтазної системи у хворих з серцево-судинною патологією, що включає взяття 5 мл крові, що вміщує гепарин, який відрізняється тим, що кров залишають стояти при 20 °C протягом двох годин, плазму крові розчиняють живильним середовищем 199 у співвідношенні 1:1 і повільно нашаровують на розчин фікол-верографіну та центрифугують при 1500 об./хв. протягом 30 хвилин, знімають кільце клітин та промивають від залишків фікол-верографіну шляхом центрифугування розчином повного живильного середовища, в який додають 80 мг/мл гентаміцину та 10 % роз-

2

чин телячої ембріональної сироватки, рахують кількість клітин у розчині в камері Горяєва на об'єктиві № 10 або 20, для отримання супернатанту в стерильні пеніцилінові флакони вносять 1 мл клітинної суміші, інкубують 24 години при температурі 37 °C, вміст флаконів центрифугують при 1000 об./хв., відбирають надосадкову рідину, до 0,1 мл надосадкової рідини додають 0,4 мл фізіологічного розчину, проводять депротейнізацію додаванням 0,2 мл 2N HClO₄, суміш центрифугують при 10000 g протягом 10 хв., до 0,4 мл супернатанту додають 2 мл реагенту (1 мл 59 mM diacetyl-monoxim + 1 мл 32 mM antipyrine + 55 mM ferric sulfate в 6 M H₂SO₄), кип'ятять протягом 15 хв. на водяній бані і після охолодження визначають величину екстинції на спектрофотометрі при довжині хвилі 465 нм, в стандартну пробу додають 0,1 мл 1 mM розчину цитруліну, і вміст цитруліну розраховують по формулі:

$$\frac{A \times 1000 \text{ мкмоль}}{B \times 3 \cdot 10^9 \text{ кл.} \times 1 \text{ годину}}, \text{ де}$$

A - показник екстинції сироватки крові;

B - показник екстинції стандарту;

1 година - час інкубації.

Корисна модель стосується медицини та біології, та може бути використана для визначення характеристики стану індуцельної NO-синтазної системи у хворих з серцево-судинною патологією.

В дослідженнях патогенезу серцево-судинних захворювань - ішемічної хвороби серця (ІХС), гіпертонічної хвороби (ГБ), порушень серцевого ритму, міокардитів, серцевої недостатності та ін., а також для оцінки інтенсивності оксидативного стресу та системного запалення, що супроводжують ці захворювання, широко використовується визначення функціонального стану індуцельної NO-синтазної ферментної системи. Остання представлена в основному в імункомпетентних клітинах периферійної крові (мононуклеарних клітинах - моноцитах, лімфоцитах).

Відомим є спосіб визначення стану NO-синтазної системи за допомогою метода визна-

чення NO₂⁻ в сироватці крові (Green I.C., David A.W., Glogovsky J at al. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids Anal. Biochem, 1982, 126, N1, P.131-138), який полягає в тому, що в 1 мл інкубаційної суміші (50 mM HEPES- pH 7,4, 1,25 mM CaCl₂, 1mM NADPH, 80 мкМ FAD, 20 мкМ тетрагідробіоптерину, 13 мкг/мл кальмодуліну, 1 mM L-аргініну, 100 од./мл супероксиддисмутази) додають 0,1 мл проби, що містить 500 мкг загального білку, який попередньо визначають по Бредфорду. Інкубацію проводять при 37 °C протягом 60 хвилин. Реакцію зупиняють додаванням 0,2 мл 2N HClO₄. Суміш центрифугують при 10000 g протягом 10 хвилин, надосадкову рідину змішують з реактивом Гріса в співвідношенні 1:1. Визначають величину екстинції на спектрофотометрі при довжині хвилі 543 нм через п'ять хвилин після змішу-

UA
(13)

57878
(11)

UA
(19)

вання. Кількість NO_2^- визначають за калібровочною кривою, побудованою для NaNO_2 .

Цей процес має наступні недоліки: він потребує використання багатьох дорогих реагентів, окрім того, вміст нітрит-аніону залежить від багатьох екзогенних чинників, таких, як продукти харчування, що містять нітроти, якості води, повітря, застосування лікарських засобів, що містять сполуки азоту. Ці фактори значно знижують точність та достовірність результатів дослідження. Нітрит-аніон є нестійким продуктом NO-синтазної реакції (період існування до 30 секунд), який схильний до подальших перетворень. Це знижує точність визначення, а тим самим ефективність лікування хворих на серцево-судинну патологію.

Найбільш близьким по технічній суті процесу, що пропонується є процес визначення вмісту цитруліну - стабільного кінцевого продукту NO-синтазної реакції в сироватці крові хворих на серцево-судинну патологію. В конкретних варіантах застосування показник вмісту цитруліну в сироватці крові здійснюють таким чином. Після взяття проби крові з неї отримують сироватку, до 0,1 мл якої додають 0,9 мл фізіологічного розчину, проводять депротеїнізацію додаванням 0,2 мл 2N HClO_4 , суміш центрифугують при 10000 g на протязі 10 хв., до 0,4 мл супернатанту додають 2 мл реагенту (1 мл 59 mM diacetyl-monoxim + 1 ml 32 mM antipyrine + 55 mM ferric sulfate in 6M H_2SO_4), кип'ятять протягом 15 хв. на водяній бані і після охолодження визначають величину екстинції на спектрофотометрі при довжині хвилі 465 нм., в контрольну пробу додають 0,1 мл фізіологічного розчину, в стандартну пробу додають 0,1 мл 100 мкМ розчин цитруліну, вміст цитруліну розраховують по формулі:

$$D = \frac{A \times C \text{ мкмоль / л}}{B}$$

A - показник екстинції сироватки крові;

B - показник екстинції стандарту;

C - вміст цитруліну в стандартній пробі - 100 мкмоль/л;

D - вміст цитруліну в пробі

Але цей показник в сироватці крові відображує сукупну активність всіх трьох ізоформ NO-синтази, що не дає можливості оцінити активність саме індукбельної NO-синтазної реакції, яка представлена в основному в імункомпетентних клітинах периферійної крові (мононуклеарних клітинах - моноцитах, лімфоцитах). Активність саме індукбельної NO-синтази, яка значно підвищується в умовах активації імункомпетентних клітин, що відповідають за розвиток системного запалення призводить до значної активації вільнорадикального окислення, кальцієвої перегрузки, денатурації білків при серцево-судинній патології.

В основу винаходу поставлене завдання розробки процесу визначення активності індукбельної NO-синтази у хворих на серцево-судинну патологію, в якому шляхом зміни дій, режимів, об'єкту дослідження та застосовуваних речовин забезпечується підвищення специфічності та точності оцінки спонтанної продукції оксиду азоту мононуклеарними лімфоцитами периферійної крові.

Для вирішення цього завдання спосіб визначення характеристики стану індукбельної NO-

синтазної системи у хворих з серцево-судинною патологією передбачає взяття 5 мл крові, що вміщує гепарин.

Новим у способі є те, що кров залишають стояти при 20 °C протягом двох годин, плазму крові розчиняють живильним середовищем 199 у співвідношенні 1:1 і повільно нашаровують на розчин фікол-верографін та центрифугують при 1500 об/хв. протягом 30 хвилин, знімають кільце клітин та промивають від залишків фікол-верографіну шляхом центрифугування розчином повного живильного середовища, в який додають 80 мг/мл гентаміцину та 10 % розчин телячої ембріональної сироватки, рахують кількість клітин у розчині в камері Горяєва на об'єктиві № 10, або 20, для отримання супернатанту в стерильні пеніцилінові флакони вносять 1 мл клітинної суміші, інкубують 24 години при температурі 37°C, вміст флаконів центрифугують при 1000 об./хв., відбирають надосадкову рідину, до 0,1 мл надосадкової рідини додають 0,4 мл фізіологічного розчину, проводять депротеїнізацію додаванням 0,2 мл 2N HClO_4 , суміш центрифугують при 10000g протягом 10 хв, до 0,4 мл супернатанту додають 2 мл реагенту (1 мл 59 mM diacetyl-monoxim + 1 ml 32 mM antipyrine + 55 mM ferric sulfate in 6M H_2SO_4), кип'ятять протягом 15 хв. на водяній бані і після охолодження визначають величину екстинції на спектрофотометрі при довжині хвилі 465 нм, в стандартну пробу додають 0,1 мл 1 мМ розчину цитруліну, і вміст цитруліну розраховують по формулі:

$$A \times 1000 \text{ мкмоль}$$

$$B \times 3.10^9 \text{ кл.} \times 1 \text{ годину}$$

A - показник екстинції сироватки крові;

B - показник екстинції стандарту;

1 година - час інкубації

Визначення за способом активності NO-синтазної реакції шляхом визначення вмісту цитруліну дозволяє більш точно встановити показник що визначає несприятливий перебіг захворювання, більш точно визначити ступень тяжкості перебігу захворювання і, тим самим, підвищити ефективність диференційної діагностики та оптимізувати лікування хворих на серцево-судинну патологію.

Спосіб що заявляється ілюструється прикладами його здійснення. В зазначених нижче прикладах спосіб здійснювали наступним чином:

Для оцінки активності індукбельної NO-синтази в якості показника використовували показник вмісту стабільного метаболіту NO-синтазної реакції - цитруліну в інкубаційному середовищі мононуклеарних клітин периферійної крові. Для цього 5 мл крові, що вміщує гепарин залишали стояти при 20 °C протягом двох годин. Для отримання моноцитарно-лімфоцитарної суміші плазму крові розчиняли живильним середовищем 199 у співвідношенні 1:1 і повільно нашаровували на розчин фікол-верографін (градієнт густини 1,076-1,078) та центрифугували при 1500 об./хв. протягом 30 хвилин. Знімали кільце клітин та промивали від залишків фікол-верографіну два рази шляхом центрифугування розчином повного живильного середовища, в який додавали 80 мг/мл гентаміци-

ну та 10 % розчин телячої ембріональної сироватки. Середу готували *ex tempore*. Кількість клітин у розчині раховували в камері Горяєва на об'єктиві № 10, або 20. Робоча концентрація клітин - 3 млн/мл. Для отримання супернатанту в стерильні пеніцилінові флакони вносили 1 мл клітинної суміші. Інкубували 24 години при температурі 37 °С. Після інкубації вміст флаконів центрифугували при 1000 об./хв., обережно відбирали надосадкову рідину. До 0,1 мл надосадкової рідини додавали 0,4 мл фізіологічного розчину. Проводили депротеїнізацію додаванням 0,2 мл 2N HClO₄. Суміш центрифугували при 10000g протягом 10 хв. До 0,4 мл супернатанту додавали 2 мл реагенту (1 мл 59 mM diacetyl-monoxim + 1 ml 32 mM antipyrine + 55 mM ferric sulfate in 6M H₂SO₄), кип'ятили протягом 15 хв. на водяній бані і після охолодження визначали величину екстинції на спектрофотометрі при довжині хвилі 465 нм. В контрольну пробу замість надосадкової рідини додавали 0,2 мл фізіологічного розчину. В стандартну пробу додавали 0,1 мл 1 mM розчину цитруліну.

Вміст цитруліну розраховували по формулі:

$$A \times 1000 \text{ мкмоль}$$

$$B \times 3.10^9 \text{ кл.} \times 1 \text{ годину}$$

A - показник екстинції сироватки крові;

B - показник екстинції стандарту;

1 година - час інкубації

Показник активності NO-синтазної реакції за вмістом цитруліну при спонтанній продукції NO в мононуклеарних лімфоцитах периферійної крові здорових донорів складає 65-35 мкмоль/10⁹ клітин/годину, в той час, коли у хворих з несприятливим перебігом захворювання цей показник вищий за 65 мкмоль/10⁹ клітин/годину.

Приклад 1. Хворий С., 45 років, діагноз: Ішемічна хвороба серця, стенокардія напруження, функціональний клас I, СН₀.

По вищеописаному процесу було проведено дослідження.

Отримані наступні результати: A - 0,054; B - 0,400;

Розрахунок: $[(0,054 \times 1000 \text{ мкмоль}) : (0,400 \times 3.10^9)] = 45 \text{ мкмоль}/10^9 \text{ кл.}/\text{год.}$

Вміст цитруліну при спонтанній продукції NO мононуклеарними лімфоцитами периферійної крові є 45 мкмоль/10⁹кл./год., що є показником норми.

Приклад 2. Хворий З., 55 років, діагноз: Ішемічна хвороба серця, стенокардія напруження та покою, функціональний клас III, атеросклеротичний кардіосклероз, СН_{IIa}. По вищеописаному процесу було проведено дослідження. Отримані наступні результати: A - 0,150; B - 0,450;

Розрахунок: $[(0,150 \times 1000 \text{ мкмоль}) : (0,450 \times 3.10^9)] = 111 \text{ мкмоль}/10^9 \text{ кл.}/\text{год.}$

Вміст цитруліну при спонтанній продукції NO мононуклеарними лімфоцитами периферійної крові є 111 мкмоль/10⁹кл. /год., що є показником перевищення норми.

Приклад 3. Хворий С., 57 років, діагноз: Ішемічна хвороба серця, нестабільна стенокардія, ФК-III, кардіосклероз, СН_{IIb}. По вищеописаному проце-

су було проведено дослідження. Отримані наступні результати: A - 0,175; B - 0,430;

Розрахунок: $[(0,175 \times 1000 \text{ мкмоль}) : (0,430 \times 3.10^9)] = 135 \text{ мкмоль}/10^9 \text{ кл.}/\text{год.}$

Вміст цитруліну при спонтанній продукції NO мононуклеарними лімфоцитами периферійної крові є 135 мкмоль/10⁹кл. /год., що є показником значного перевищення норми.

Приклад 4. Хворий З., 50 років, діагноз: Гіпертонічна хвороба II ст., без наявності коронарного атеросклерозу, гіпертензивне серце, СН₀. По вищеописаному процесу було проведено дослідження. Отримані наступні результати: A - 0,075; B - 0,450;

Розрахунок: $[(0,075 \times 1000 \text{ мкмоль}) : (0,450 \times 3.10^9)] = 55 \text{ мкмоль}/10^9 \text{ кл.}/\text{год.}$

Вміст цитруліну при спонтанній продукції NO мононуклеарними лімфоцитами периферійної крові є 55 мкмоль/10⁹кл. /год., що є показником норми.

Приклад 5. Хворий Б., 52 роки, діагноз: гіпертонічна хвороба серця I-II ст. без наявності коронарного атеросклерозу, кризовий перебіг захворювання. По вищеописаному способу було проведено дослідження.

Отримані наступні результати: A - 0,110; B - 0,420;

Розрахунок: $[(0,110 \times 1000 \text{ мкмоль}) : (0,420 \times 3.10^9)] = 87 \text{ мкмоль}/10^9 \text{ кл.}/\text{год.}$

Вміст цитруліну при спонтанній продукції NO мононуклеарними лімфоцитами периферійної крові є 87 мкмоль/10⁹кл. /год., що є показником перевищення норми.

Приклад 6. Хворий М., 56 років, діагноз: гіпертонічна хвороба серця II-III ст. без наявності коронарного атеросклерозу. Тяжкий кризовий перебіг захворювання.

По вищеописаному способу було проведено дослідження. Отримані наступні результати: A - 0,145; B - 0,450;

Розрахунок: $[(0,145 \times 1000 \text{ мкмоль}) : (0,450 \times 3.10^9)] = 107 \text{ мкмоль}/10^9 \text{ кл.}/\text{год.}$

Вміст цитруліну при спонтанній продукції NO мононуклеарними лімфоцитами периферійної крові є 107 мкмоль/10⁹кл. /год., що є показником значного перевищення норми.

Приклад 7. Хворий Ф., 42 роки, діагноз: ДКМП - ділятаційна кардіоміопатія СН_{IIa}. По вищеописаному процесу було проведено дослідження. Отримані наступні результати: A - 0,135; B - 0,440;

Розрахунок: $[(0,135 \times 1000 \text{ мкмоль}) : (0,440 \times 3.10^9)] = 102 \text{ мкмоль}/10^9 \text{ кл.}/\text{год.}$

Вміст цитруліну при спонтанній продукції NO мононуклеарними лімфоцитами периферійної крові є 102 мкмоль/10⁹кл. /год., що є показником значного перевищення норми.

Приклад 8. Хворий Д., 48 років, діагноз: Ревматизм у стадії ремісії, комбінована мітральна та аортальна вада серця, кардіосклероз, СН₀. По вищеописаному процесу проведено дослідження. Отримані наступні результати: A - 0,065; B - 0,430;

Розрахунок: $[(0,065 \times 1000 \text{ мкмоль}) : (0,430 \times 3.10^9)] = 50 \text{ мкмоль}/10^9 \text{ кл.}/\text{год.}$

Вміст цитруліну при спонтанній продукції NO мононуклеарними лімфоцитами периферійної

крові є 50 мкмоль/10⁹кл. /год., що є показником норми.

Приклад 9. Хворий Ф., 49 років, діагноз: Ревматизм в стадії ремісії, комбінована мітральна вада серця, кардіосклероз, СН_{III}в.

По вищеописаному процесу було проведено дослідження.

Отримані наступні результати: А - 0,165; В - 0,450;

Розрахунок: [(0,165 x 1000мкмоль): (0,450 x 3.10⁹)] = 122 мкмоль/10⁹кл. /год.

Вміст цитруліну при спонтанній продукції NO мононуклеарними лімфоцитами периферійної крові є 122 мкмоль/10⁹кл/год., що є показником значного перевищення норми.

На порівняння з прототипом спосіб дає можливість диференційованого підходу до діагностики різних серцево-судинних захворювань, перебіг яких супроводжується активацією NO-синтазної системи, що дає можливість оптимізації лікувального процесу.