



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **98906**

(13) **U**

(51) МПК

C12Q 1/42 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

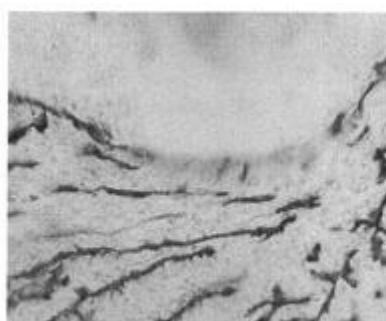
(21) Номер заявки: u 2014 12923	(72) Винахідник(и): Горпинченко Ігор Іванович (UA), Ситенко Андрій Михайлович (UA), Ядловський Олег Євгенович (UA), Матвієнко Анатолій Васильович (UA)
(22) Дата подання заявки: 03.12.2014	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 12.05.2015	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 12.05.2015, Бюл.№ 9	(73) Власник(и): ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ УРОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ", вул. Ю. Коцюбинського, 9-а, м. Київ, 04053 (UA), ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГІЇ ТА ТОКСИКОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ", вул. Ежена Потье, 14, м. Київ, 03680 (UA)

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ СТАНУ ЕНДОТЕЛІЮ ПЕЧЕРИСТОЇ ТКАНИНИ СТАТЕВОГО ЧЛЕНА

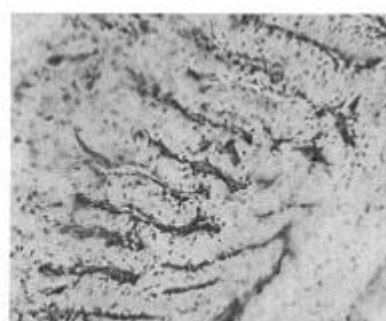
(57) Реферат:

Спосіб оцінки стану ендотелію печеристої тканини статевого члена полягає у визначенні активності клітинних ферментів. Як маркер структурно-функціональної цілісності ендотелію використовують активність лужної фосфатази та аденозинтрифосфатази, яку встановлюють за реакцією утворення фосфатів, що мають вигляд чорних та темно-коричневих депозитів. Відсутність або зниження інтенсивності їх забарвлення оцінюють як пошкодження ендотелію печеристої тканини статевого члена та пригнічення обміну речовин.

UA 98906 U



A



Б

Fig. 1

Спосіб належить до медицини, а саме до урології, андрології та сексології, і може бути використаний у експериментальних дослідженнях, діагностиці та лікуванні еректильної дисфункції чоловіків.

Ендотеліальні клітини печеристої тканини статевго члена здійснюють регуляторні впливи на пенільну гемодинаміку як у стані спокою, так і при ерекції. Це відбувається шляхом секреції NO - первинного медіатора релаксації гладком'язових клітин печеристої тканини та кавернозних артерій. Еректильна дисфункція, серед інших причин, обумовлюється зниженням продукції NO внаслідок загибелі ендотеліальних клітин та/або пригнічення ендотеліальної NO синтази (eNOC). Таким чином, визначення цілісності та функціонального стану ендотелію печеристої тканини є важливим в діагностиці та лікуванні еректильної дисфункції. Для цього використовують різні імуногістохімічні методи.

Відомий імуногістохімічний спосіб оцінки стану ендотелію печеристої тканини (1), який полягає у взаємодії моноклональних антитіл RECA з поверхневим антигеном ендотеліальних клітин, з наступною їх ідентифікацією специфічним барвником.

Недоліком цього способу є те, що він не дає інформацію стосовно активності обмінних процесів у ендотеліальних клітинах.

Відомий також спосіб оцінки стану ендотелію печеристої тканини (2), взятий нами за прототип, що полягає у визначенні активності ферменту eNOC за допомогою поліклональних антитіл класу IgG, з наступною їх ідентифікацією специфічним барвником.

Недоліком способу є те, що eNOC не є надійним маркером стану ендотелію печеристої тканини, оскільки її активність залежить від фаз ерекційного циклу. Крім цього активність цього ферменту може компенсаторно посилюватись на початку дії патологічного чинника.

Як маркерні ферменти замість eNOC доцільно використовувати фосфатази. Лужна фосфатаза (КФ 3.2.1.30) - неспецифічний фермент інтегрований у клітинну мембрану, що каталізує трансфосфорилування - перенесення фосфатних груп з одних органічних сполук на інші. Аденозинтрифосфатаза (КФ 3.6.1.3) каталізує розщеплення АТФ, її активність відображає рівень енергоємних процесів у клітині (синтез, транспорт), при цьому активність ферментів визначають за розщепленням їх субстратів, відповідно 3-гліцерио-фосфату-На та двонатрієвої солі АТФ, фосфатні групи, що утворюються при гідролізі, комплексуються з важкими металами і осаджуються у вигляді чорних та темно-коричневих депозитів.

В основу корисної моделі поставлена задача удосконалити спосіб оцінки стану ендотелію печеристої тканини статевго члена шляхом гістохімічного визначення активності лужної фосфатази та аденозинтрифосфатази, яку встановлюють за реакцією утворення фосфатів, що мають вигляд чорних та темно-коричневих депозитів, відсутність або зниження інтенсивності їх забарвлення, оцінюють як пошкодження ендотелію печеристої тканини статевго члена та пригнічення обміну речовин, що дозволяє одночасно оцінити структурну цілісність та рівень обмінних процесів у ендотеліальних клітинах, також і у чоловіків з еректильною дисфункцією.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб оцінки стану ендотелію печеристої тканини статевго члена, який полягає у визначенні активності клітинних ферментів, згідно з корисною моделлю, як маркери структурно-функціональної цілісності ендотелію використовують активність лужної фосфатази та аденозинтрифосфатази, яку встановлюють за реакцією утворення фосфатів, що мають вигляд чорних та темно-коричневих депозитів, відсутність або зниження інтенсивності їх забарвлення, оцінюють як пошкодження ендотелію печеристої тканини статевго члена та пригнічення обміну речовин.

Спосіб оцінки стану ендотелію печеристої тканини статевго члена виконують в два етапи наступним чином: оцінку структурної цілісності - проводять з визначенням активності лужної фосфатази, для цього заморожені зрізи печеристої тканини статевго члена 10-15 мкм завтовшки, попередньо зафіксовані у охолоджену розчині 10 % нейтрального формаліну протягом 4-24 годин при температурі 0-4 °С, наклеюють на предметні скельця, поміщають в інкубаційне середовище і експонують у термостаті при 37 °С від 1 час 30 хв до 4 год. Для приготування інкубаційного середовища до 10 мл 3 % розчину 3-гліцериофосфату додають 10 мл мединалу натрію, 20 мл 2 % розчину хлориду кальцію CaCl_2 , 1 мл 5 % розчину сульфату магнію MgSO_4 та 5 мл дистильованої води, рН середовища має бути 9,4, змутніння відфільтровують, після чого зрізи промивають водою протягом 3-5 хв та обробляють 2 % розчином хлориду кобальту CoCl_2 , ополіскують у дистильованій воді та обробляють сульфідом амонію до почорніння зрізу, зрізи зневоднюють, просвітлюють і консервують у бальзамі. Цілісність ендотелію печеристої тканини статевго члена визначають за розташуванням і інтенсивністю забарвлення чорних депозитів (кристалів сульфату кобальту) - відсутність депозитів або зниження інтенсивності забарвлення оцінюють як пошкодження ендотелію печеристої тканини статевго члена;

- оцінку рівня енергоємних процесів - проводять з визначенням активності аденозинтрифосфатази, для цього приготувані зрізи поміщують в інкубаційне середовище на 10-60 хв при 37°. Для приготування інкубаційного середовища 25 мг двонатрієвої солі АТФ розчиняють у 20 мл дистильованої води, додають у наступному порядку: 20 мл 0,2М трис-буферу (pH 7,2), 1-3 мл 2 % розчину нітрату свинцю $Pb(NO_3)_2$, 3,5 мл 0,1М розчину сульфату магнію $MgSO_4$, 2 мл дистильованої води, при необхідності інкубаційне середовище фільтрують. Після інкубації зрізи ретельно промивають у декількох порціях дистильованої води, обробляють розчином жовтого сульфиду амонію протягом 1 хв, поки не з'явиться темно-коричневе забарвлення зрізу, ополіскують та консервують після зневоднення у бальзамі. Активність енергетичних процесів в ендотелії печеристої тканини статевго члена оцінюють за наявністю коричнево-чорних депозитів, що відповідають місцям аденозинтрифосфатазної активності, відсутність або зниження інтенсивності забарвлення вказує на пригнічення обміну речовин.

Дані гістохімічного дослідження пояснюють ілюстративними матеріалами.

На фіг. 1 представлене дослідження фосфатазної активності у печеристій тканині статевго члена інтактного щура лінії Вістар,

А - активність лужної фосфатази, зб. x200;

В - активність аденозинтрифосфатази, зб. x200.

На фіг. 2 - фосфатазної активності у печеристій тканині статевго члена щура лінії Вістар з гіперглікемією з групи плацебо,

А - активність лужної фосфатази, зб. x200;

В - активність аденозинтрифосфатази, зб. x200

На фіг. 3 - фосфатазної активності у печеристій тканині статевго члена гіперглікемічних щурів, що отримували інтракавернозні ін'єкції мезенхімальних стовбурових клітин,

А - активність лужної фосфатази, зб. x200;

В - активність аденозинтрифосфатази, зб. x200

Практичне використання способу, що заявляється, проведено у відділі сексопатології та андрології ДУ "Інститут урології НАМН України" та ДУ "Інститут фармакології та токсикології НАМН України" на 60 щурах лінії Вістар, з яких 30 були інтактними, а інші 30 з еректильною дисфункцією в умовах стрептозотоцін індукованого цукрового діабету (15 - отримували лікування, 15 - плацебо).

Наводимо приклади практичного застосування способу, що заявляється.

Приклад 1. Протокол № 1, інтактний щур лінії Вістар, віком 4 місяці, при дослідженні зрізів печеристої тканини статевго члена запропонованим методом, в ендотеліальних клітинах виявляють високу активність лужної фосфатази в ендотелії печеристої тканини статевго члена у вигляді інтенсивно забарвлених чорних депозитів (фіг. 1А) та аденозинтрифосфатази у вигляді інтенсивно забарвлених коричнево-чорних депозитів, що вказує на високу активність аденозинтрифосфатази в ендотелії печеристої тканини статевго члена (фіг. 1Б).

Приклад 2. Протокол № 2, щур лінії Вістар, віком 4 місяці з гіперглікемією з групи плацебо, при дослідженні зрізів печеристої тканини статевго члена запропонованим методом, показано, що інтенсивність забарвлення ендотеліальних клітин знижена за рахунок зменшення активності лужної фосфатази (фіг. 2А) та аденозинтрифосфатази (фіг. 2Б), що є ознаками пригнічення обмінних процесів та загибелі ендотеліальних клітин.

Приклад 3. Протокол № 3, щур лінії Вістар, віком 4 місяці, з гіперглікемічної групи щурів, що отримують інтракавернозні ін'єкції мезенхімальних стовбурових клітин; при дослідженні зрізів печеристої тканини статевго члена запропонованим методом, спостерігають вогнищеве відновлення фосфатазної активності - чорні депозити відповідають ділянкам з відновленим ендотелієм (маркер - активність лужної фосфатази) (фіг. 3А) та аденозинтрифосфатази - коричнево-чорні депозити (маркер активності аденозинтрифосфатази) вказують на відновлення структури та функції ендотеліальних клітин (фіг. 3Б).

Таким чином, спосіб оцінки стану ендотелію печеристої тканини статевго члена, що включає гістохімічне визначення активності лужної фосфатази та аденозинтрифосфатази як маркерних ферментів, дозволяє одночасно оцінити структурну цілісність та рівень обмінних процесів у ендотеліальних клітинах статевго члена у чоловіків з еректильною дисфункцією, вплив на них патологічних та терапевтичних чинників. Специфічність способу становить 95 %. Чутливість - 98 %.

Джерела інформації:

1. Duijvestijn A.M., van Goor H., Klatter F., Majoor G.D., van Bussel E., van Breda Vriesman P.J. Antibodies defining rat endothelial cells: RECA-1, a pan-endothelial cell-specific monoclonal antibody // Lab. Invest. - 1992. - 66(4). - P. 459-466.

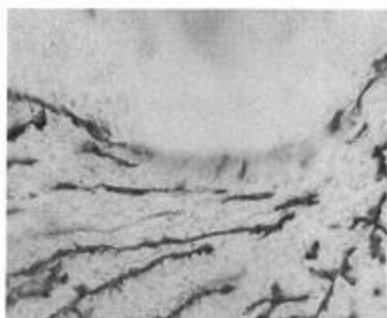
2. Hu C, Wang F., Dong Y., Dai J. A novel method to establish a rat ED model using internal iliac artery ligation combined with hyperlipidemia // PLoS One. - 2014. - 21;9(7):e102583.doi: 10.1371.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

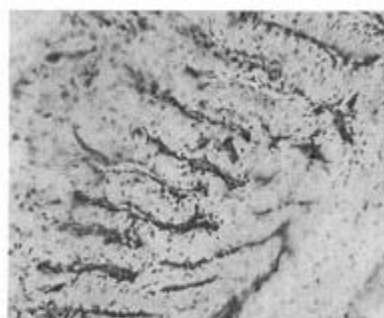
5

Спосіб оцінки стану ендотелію печеристої тканини статевго члена, який полягає у визначенні активності клітинних ферментів, який **відрізняється** тим, що як маркери структурно-функціональної цілісності ендотелію використовують активність лужної фосфатази та аденозинтрифосфатази, яку встановлюють за реакцією утворення фосфатів, що мають вигляд чорних та темно-коричневих депозитів, відсутність або зниження інтенсивності їх забарвлення оцінюють як пошкодження ендотелію печеристої тканини статевго члена та пригнічення обміну речовин.

10



А

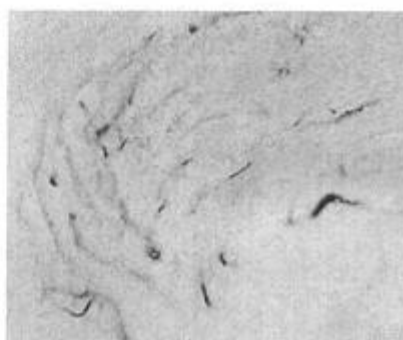


Б

Фиг. 1

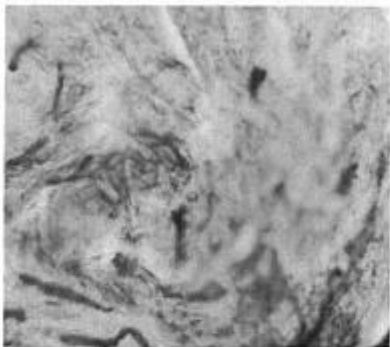


А

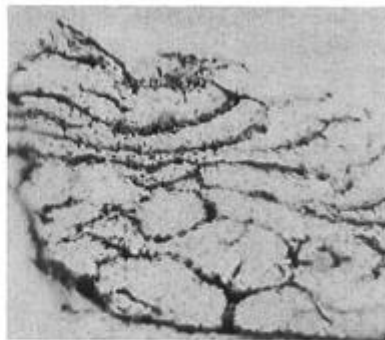


Б

Фиг. 2



А



Б

Fig. 3

Комп'ютерна верстка М. Мацело

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601