



УКРАЇНА

(19) UA (11) 11092 (13) U

(51) 7 G01N33/48

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ**ОПИС**
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту**(54) СПОСІБ ДИФЕРЕНЦІАЛЬНОЇ ДІАГНОСТИКИ АРТЕРІАЛЬНОЇ ГІПЕРТЕНЗІЇ**

1

2

(21) u200504731

(22) 20.05.2005

(24) 15.12.2005

(46) 15.12.2005, Бюл. № 12, 2005 р.

(72) Горобець Наталія Михайлівна

(73) ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ ІМ. М.І. ПИРОГОВА

(57) Спосіб диференціальної діагностики артеріальної гіпертензії, що включає дослідження крові,

який відрізняється тим, що визначають рівні стабільних метаболітів оксиду азоту та ендотеліну-1 і на основі цих показників виводять коефіцієнт $K = ET-1 / (NO_2 + NO_3)$, де ET-1 - рівень ендотеліну в плазмі крові; NO₂ - рівень нітриту азоту в плазмі крові; NO₃ - рівень нітрату азоту в плазмі крові.

Корисна модель відноситься до медицини, зокрема, кардіології і може бути використана як додатковий диференціально-діагностичний критерій при вирішенні питання про генез артеріальної гіпертензії - есенціальна чи нефрогенно обумовлена артеріальна гіпертензія.

На даний час відсутні біохімічні способи для диференціальної діагностики артеріальної гіпертензії. Відомий біохімічний спосіб диференціальної діагностики артеріальної гіпертензії полягає в тому, що в клінічній практиці використовують визначення в крові рівнів сечовини та креатиніну, які при есенціальній артеріальній гіпертензії підвищуються в III стадії захворювання, а при нефрогенній артеріальній гіпертензії - є ранніми маніфестними ознаками даного захворювання [Й.Е. Тареева. Справочник по нефрології. - 2000г.].

Однак, при гіпертонічній хворобі підвищення рівнів сечовини та креатиніну відбувається через 10-20 років від початку захворювання, а при нефрогенній артеріальній гіпертензії на більш ранніх строках - через 5-10 років.

При артеріальній гіпертензії спостерігається дисбаланс вазодилатуючих та вазоконстрикторних факторів, який може бути охарактеризований коефіцієнтом $ET-1 / (NO_2 + NO_3)$. В основу корисної моделі "Спосіб диференціальної діагностики артеріальної гіпертензії" поставлено завдання шляхом визначення коефіцієнту $ET-1 / (NO_2 + NO_3)$ прискорити та підвищити точність диференціальної діагностики при артеріальних гіпертензіях різного генезу.

Поставлене завдання здійснюється способом, що передбачає дослідження крові, в якому згідно з корисною моделлю визначають рівні стабільних

метаболітів оксиду азоту (NO₂ і NO₃) та ендотеліну-1 (ET-1) і на основі цих показників виводять коефіцієнт - $ET-1 / (NO_2 + NO_3)$. У практично здорових осіб цей коефіцієнт дорівнює, в середньому, $0,3 \pm 0,05$ од., при есенціальній артеріальній гіпертензії - $1,38 \pm 0,06$ од., а при артеріальній гіпертензії нефрогенного генезу - $2,85 \pm 0,04$ од. Персентильний статистичний аналіз значень коефіцієнту показав, що референтні його значення у практично здорових осіб склали $0,17-0,52$ од., у хворих на гіпертонічну хворобу - $0,99-1,77$ од., у хворих з нефрогенною артеріальною гіпертензією - $2,12-3,58$ од. Встановлено такі диференціально-діагностичні критерії: при значеннях коефіцієнту менше 2,0 од. у хворих з артеріальною гіпертензією можна думати про гіпертонічну хворобу, значення коефіцієнту - 2,0 од. і більше свідчать про нефрогенний генез артеріальної гіпертензії.

Спосіб здійснюється таким чином:

Вміст оксиду азоту (NO) визначали за концентрацією його стабільних метаболітів - нітриту (NO₂) та нітрату (NO₃) в цитратній крові " спектрофотометричним методом з реактивом Гріса з сульфаниловою кислотою та 1 - нафтоламіном.

Визначення нітриту-аніону (NO₂) в плазмі крові спектрофотометричним методом Гріна з використанням реактиву Гріса.

Реактиви: - свіжо приготувана плазма людини;

- 30% розчин сульфату цинку;

- реактив Гріса (сухий порошок 500мг в 100мл дистильованої води).

До свіжої плазми крові об'ємом 1,5мл додавали 1мл 30% сульфату цинку для депротейнізації і

(19) UA (11) 11092 (13) U

ретельно перемішували. Відцентрифугувували плазму крові при 3000об/хв. 15 хвилин. Супернатант зливали, до нього додавали рівний об'єм реактиву Гріса і ретельно перемішували. При кімнатній температурі залишали на 40-45хв. до появи рожевого забарвлення. Вимірювали при довжині хвилі 540нм. Калібровочна крива - відомі величини NaNO_2 .

Визначення нітрат-аніону (NO_3) спектрофотометричним методом з використанням сухого відновлювача.

Реактиви: - 30% розчин сульфату цинку;

- сухий відновлювач (100г сульфату барію, 10г сульфату марганцю, 2г цинкового пилу, 75г лимонної кислоти, 4г сульфанилової кислоти, 2г L-нафтиламіну фірми "Merck");

- 12% розчин оцтової кислоти.

В свіжу плазму крові (1,5мл) додавали 1мл 30% сульфату цинку для депротейнізації, ретельно перемішували, відцентрифугувували плазму крові при 3000об/хв. 15 хвилин. Супернатант зливали і до нього додавали 100мг сухого відновлювача, ретельно перемішували і залишали на 10хв. в кімнаті. Далі додавали 1,5мл 12% оцтової кислоти, ретельно перемішували і залишали на 15хв. при кімнатній температурі. Відцентрифугувували при 3000об/хв. 15хв. Надосадову рідину зливали в пробірки. Вимірювали при довжині хвилі 540нм. Калібровочна крива - відомі величини NaNO_3 .

Рівень ET-1 в плазмі визначали імуноферментним методом. Забір крові у хворих робили зранку натщесерце у кількості 5мл з додаванням 5мг ЕД-ТА. Відцентрифугувували кров при 1600g на протязі 15 хвилин при 0°C. Перенесли плазму в нову поліпропіленову пробірку.

Хроматографічні реагенти:

1. Буфер А: 1% розчин TFA (для HPLC) в дистильованій воді

2. Буфер В: 60% ацетонітрил (для HPLC), 1% TFA і 39% дистильованої води. Процедура екстракції:

1. Додати рівну кількість буферу А до плазми. Відцентрифугувувати при 6000-17000g на протязі 20 хвилин при 4°C.

2. Обробити розподільний картридж, який містить 200мг C18 (Кат. - № RIK-SEP COL1), 1мл 100% ацетонітрилу (буфер D, один раз) або 1мл 60% ацетонітрилу (буфер В, один раз), після чого обробити картридж 3мл буферу А (3 рази).

3. Помістити суміш зразка з буфером в оброблений картридж C18. Повільно промити картридж три рази 3мл буферу А, видалити рідину.

4. Повільно елюювати білок 3мл буферу В (один раз), зібрати елюат в поліпропіленову пробірку.

5. Випарити рідину до висушування зразку в центрифужному концентраторі.

6. Зберігати сухий екстракт при -20°C. Об'єм рідини для розведення осаду визначається очікуваною концентрацією білку в зразку. Якщо в ході аналізу значення концентрації білку не потрапляє в лінійний діапазон калібровочної кривої набору, необхідно розведення або концентрація зразку.

Приклад I. Хвора В., 47 років. Діагноз: Гіпертонічна хвороба II стадії. Гіпертрофія лівого шлуночку. Гіпертонічна ангіопатія сітківки. Неускладнені гіпертонічні кризи. Серцева недостатність IIА стадії.

Рівень ендотеліну-1 в плазмі крові 14,94пг/мл, рівень (NO_2+NO_3) - 10,46мкмоль/л.

Коефіцієнт $\text{ET-1}/(\text{NO}_2+\text{NO}_3)$ складає 1,4од. Так як значення коефіцієнту менше 2,0од., можна діагностувати у хворої есенціальну артеріальну гіпертензію.

Приклад II. Хвора А., 55 років. Діагноз: Хронічний гломерулонефрит, сечовий варіант в стадії загострення. Хронічна ниркова недостатність I ступеню. Ангіопатія судин сітківки. Міокардіодистрофія. Серцева недостатність I стадії.

Рівень ендотеліну-1 в плазмі крові 37,01пг/мл, рівень (NO_2+NO_3) - 15,46мкмоль/л.

Коефіцієнт $\text{ET-1}/(\text{NO}_2+\text{NO}_3)$ складає 2,4од. Так як коефіцієнт $\text{ET-1}/(\text{NO}_2+\text{NO}_3)$ знаходиться в межах 2,12-3,58од., ми можемо діагностувати артеріальну гіпертензію нефрогенного генезу.