



УКРАЇНА

(19) UA (11) 42338 (13) U
(51) МПК (2009)
A61K 35/14

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ НАЯВНОСТІ АУТОІМУННОЇ РЕАКЦІЇ У ХВОРИХ НА ІШЕМІЧНУ ХВОРОБУ СЕРЦЯ

1

2

(21) u200902163

(22) 12.03.2009

(24) 25.06.2009

(46) 25.06.2009, Бюл.№ 12, 2009 р.

(72) ЄВСТРАТОВА ІРИНА НИКИФОРІВНА, МХИ-
ТАРЯН ЛАУРА СОКРАТІВНА, ГАВРИЛЕНКО ТЕ-
ТЯНА ІЛЛІВНА, ВАСИЛИНЧУК НАТАЛІЯ МИКОЛА-
ЇВНА, ЯКУШКО ЛЮДМИЛА ВАСИЛІВНА

(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР "ІНСТИ-
ТУТ КАРДІОЛОГІЇ ІМЕНІ АКАДЕМІКА М.Д. СТРА-
ЖЕСКА" АМН УКРАЇНИ

(57) Спосіб визначення наявності аутоімунної ре-
акції у хворих на ішемічну хворобу серця, що вклю-
чає забір крові, отримання сироватки, визначення
вмісту кінцевих продуктів вільнорадикального оки-
слення білків сироватки крові - 1,4-
динітрофенілгідрозонів, який **відрізняється** тим,
що для аналізу беруть 0,1 мл сироватки крові хво-
рого, осад білків сироватки крові здійснюють за
допомогою (0,9 мл) 20 % розчину трихлороцтової
кислоти (ТХОК), до денатурованих білків додають
рівний об'єм (1 мл) 0,1 М 2,4-ДФГ (2,4-
динітрофенілгідрозин), що розчинений в 2N HCl і

етиловому спирті та витриманого в киплячій бані
до повного розчинення 2,4-ДФГ, в контрольну про-
бу додають замість 2,4-ДФГ рівний об'єм 2N HCl,
інкубацію здійснюють при кімнатній температурі
протягом однієї години, потім проби центрифугу-
ють при 6000 g протягом 15-20 хвилин, осад про-
мивають 3 рази розчином етанол-етилацетат (1:1),
центрифугують при 6000 g протягом 15-20 хвилин
для екстракції ліпідів та 2,4-ДФГ, який не прореа-
гував з карбонільними групами окислених білків,
отриманий осад підсушують з метою усунення
розчинника, що залишився (етанол-етилацетату), і
потім розчиняють в 8 М розчині сечовини, сечови-
ну приливають до осаду в об'ємі 4 мл і витримують
в киплячій бані протягом 5 хвилин до повного роз-
чинення, оптичну щільність 1,4-
динітрофенілгідрозонів, що утворилися, реєстру-
ють на спектрофотометрі при довжині хвилі 370
нм, результати розраховують як оптичну щільність
на мілілітр сироватки крові, оптична щільність -
умовна одиниця Од/мл, та при значеннях, вищих
за 6,5 Од/мл, роблять висновок про наявність ау-
тоімунної реакції.

Корисна модель стосується медицини та біо-
логії, та може бути використана для визначення
наявності аутоімунного процесу, що має значення
для діагностики розвитку та прогресування ішемі-
чної хвороби серця.

Відомим є спосіб визначення наявності (біль-
ше 5 %) або відсутності (менше 5 %) аутоенсибі-
лізації по клітинному типу в реакції бласттрансфо-
рмації лімфоцитів до антигенів судин (см.
Стефани Д.Ф., Вельтищев Ю.Е. Клиническая им-
мунология и иммунология детского возраста
//М.: Медицина, 1996. - С.372; Иммунологические
методы. Под ред. Г.Фримеля,- М.: Медицина.-
1987. - С.249-302), який полягає в тому, що в сте-
рильних умовах готують повне поживне середо-
вище (ППС), що складається з середовища 199
(Ігла-MEM, RPMI 1640), розчину гентаміцину в
концентрації 80 мкг/мл (можна використовувати
інші антибіотики) і 10 % фетальної телячої сирова-
тки (20 % сироватки крупної рогатої худоби). ППС

готують безпосередньо перед постановкою реак-
ції. Мітогени та антигени стерилізують фільтру-
ванням скрізь фільтри з діаметром пор 20 мікрон.
Розчини міогенів та антигенів зберігаються в за-
мороженому стані в мікро-пробірках. Всі процеду-
ри проводяться над газовою горілкою. Флакони
щільно закриваються пробками. До 700 мкл ППС
додають 100 мкл робочого розчину міогену або
антигену та 200 мкл плазми крові. Інкують проби
з мітогеном 72 години, а з антигеном 5-7 діб при 37
°C (пробірки зтрушують кожндобово). Після інку-
бації вміст пробірок ресуспендують і центрифугу-
ють 10 хвилин при 1000 об/хв. Відбирають надо-
садкову рідину, осад ресуспендують, клітинну
суміш переносять на предметне скло. Мазки ви-
сушують, фіксують метиловим спиртом. Окраску
проводять по Романовському-Гімза протягом 20-
25 хвилин. Окрашені мазки промивають в проточ-
ній воді та висушують. В світовому мікроскопі під
імерсійною системою визначають відсоток бластів

U
(13)

42338
(11)

UA
(19)

відносно загальної кількості лімфоцитів (на 200-500 клітин). В контрольні проби додають 800 мкл ППС та 200 мкл плазми крові. Нормальні значення - менше 5 %.

Описаний спосіб визначення наявності ауто-сенсibiliзації по клітинному типу має наступні недоліки. Виконання цього способу вимагає використання великої кількості процедур, значних витрат часу (від трьох до семи діб), використання дорогих реагентів та апаратури.

Найбільш близьким по технічній суті запропонованому є спосіб визначення наявності (більше 200 мОд/мл) або відсутності (менше 200 мОд/мл) аутосенсibiliзації по гуморальному типу за рівнем аутоантитіл до окислених ліпопротеїдів низької щільності в сироватці крові з використанням імуноферментних тест-систем (BI-20032 Biomedica Gruppe, Відень, Австрія), який полягає в тому, що в лунки планшету поміщають по 200 мкл буферного розчину, потім додають по 20 мкл матеріалів (стандарт, контроль, біозразки) розведені буферним розчином 1:50. Інкують протягом півтори години при 37 °С. Після інкубації зливають надосадкову рідину. Осад промивають чотири рази 300 мкл розведеним водою 1:20 буферним розчином. Підсушують фільтрувальним папером. В усі лунки додають по 100 мкл кон'югату (моноклональні антитіла IgG-HRPO). Інкують 30 хвилин при кімнатній температурі. Після інкубації підсушують фільтрувальним папером. В усі лунки додають по 100 мкл субстрату (TMB - розчин). Інкують 15 хвилин при кімнатній температурі в темному місці. Потім додають в усі лунки по 50 мкл зупиняючого розчину (H₂ SO₄). Вимірюють абсорбцію негайно при довжині хвилі 450 та 620 нм. Розрахунок проводять відніманням від значення проби значення контролю (з урахуванням розведення 1:50) на мілілітр сироватки крові. Нормальні значення - менше, ніж 200 мОд/мл.

Цей спосіб має наступні недоліки: витрати великих коштів на готові імуноферментні тест-системи, використання спеціальної апаратури (елізопроцесор).

В основу способу поставлено завдання розробки способу визначення наявності аутоімунної реакції у хворих на ішемічну хворобу серця, заснованому на визначенні ступеня активації вільнорадикального окислення білків сироватки крові у хворих на ішемічну хворобу серця, в якому шляхом зміни дій, режимів та застосування речовин забезпечується економія часу та коштів та підвищується специфічність та точність оцінки наявності аутоімунного процесу у хворих на ішемічну хворобу серця.

Для цього процес передбачає визначення вмісту кінцевих продуктів вільнорадикального окислення білків сироватки крові - 1,4-дінитрофенілгідразонів у хворих на ішемічну хворобу серця.

Новим у способі є те, що для аналізу беруть 0,1 мл сироватки крові хворого, осад білків сироватки крові здійснюють за допомогою (0,9 мл) 20 % розчину трихлороцтової кислоти (ТХОК), до денатурованих білків додають рівний об'єм (1мл) 0.1М 2,4 - ДФГ (2,4-дінитрофенілгідразин), що розчине-

ний в 2N HCl і етиловому спирті та видержаного в киплячій бані до повного розчинення 2,4-ДФГ, в контрольну пробу додають замість 2,4-ДФГ рівний об'єм 2N HCl, інкубацію здійснюють при кімнатній температурі протягом однієї години, потім проби центрифугують при 6000 g протягом 15-20 хвилин, осад промивають 3 рази розчином етанол-етилацетат (1:1), центрифугують при 6000 g протягом 15-20 хвилин для екстракції ліпідів та 2,4-ДФГ, який не прореагував з карбонільними групами окислених білків, отриманий осад підсушують з метою усунення розчинника, що залишився (етанол-етилацетат) і потім розчиняють в 8М розчині сечовини, сечовину приливають до осаду в об'ємі 4 мл і витримують в киплячій бані протягом 5 хвилин до повного розчинення, оптичну щільність 1,4-дінитрофенілгідразонів, що утворилися реєструють на спектрофотометрі при довжині хвилі 370 нм., результати розраховують як оптичну щільність на мілілітр сироватки крові, оптична щільність - умовна одиниця Од/мл., та при значеннях, вищих за 6,5 Од/мл роблять висновок про наявність аутоімунної реакції.

Показано, що ішемічна хвороба серця супроводжується окисдаивним стресом в результаті надмірної активації окислювальних реакцій та пригнічення антиоксидантного захисту організму. В умовах оксидативного стресу окрім ліпідних молекул окислювальній модифікації можуть підлягати і білкові компоненти організму, що призводить до модифікації (окислення) їх N-кінцевої частини амінокислоти та зміна їх структурної організації, що може стати причиною придбання останніми антигенних властивостей та ініціації аутоімунного процесу до власних білків організму. Саме цей процес лежить в основі розвитку аутоімунних уражень. Вміст кінцевих продуктів вільнорадикального окислення білків сироватки крові - 1,4-дінитрофенілгідразонів у хворих на ішемічну хворобу серця має чітку корелятивну залежність від наявності аутосенсibiliзації у хворих на ішемічну хворобу серця.

Перевагою над існуючими методами є те, що для оцінки наявності аутосенсibiliзації використовується лише визначення вмісту 1,4-дінитрофенілгідразонів в 0,1 мл сироватки крові.

Внаслідок цього підвищується економія робочого часу, хімічних реагентів (реагенти для імуноферментного аналізу мають високу ціну), специфічність, точність діагностики і тим самим - ефективність лікування хворих на ішемічну хворобу, які мають ознаки окислювального стресу.

Для аналізу беруть 0,1 мл сироватки крові хворого. Осад білків сироватки крові здійснюється за допомогою (0,9 мл) 20 % розчину трихлороцтової кислоти (ТХОК). До денатурованих білків додають рівний об'єм (1мл) 0,1М 2,4-ДФГ (2,4-дінитрофенілгідразин), що розчинений в 2N HCl і етиловому спирті та видержаного в киплячій бані до повного розчинення 2,4-ДФГ. В контрольну пробу додають замість 2,4-ДФГ рівний об'єм 2N HCl. Інкубацію здійснюють при кімнатній температурі протягом однієї години. Потім проби центрифугують при 6000 g протягом 15-20 хвилин. Осад промивають 3 рази розчином етанол - етилацетат

(1:1), центрифугують при 6000 g протягом 15-20 хвилин для екстракції ліпідів та 2,4-ДФГ, який не прореагував з карбонільними групами окислених білків. Отриманий осад підсушують з метою усунення розчинника, що залишився (етанол-етілацетата) і потім розчиняють в 8М розчині сечовини. Сечовину приливають до осаду в об'ємі 4 мл і витримують в киплячій бані протягом 5 хвилин до повного розчинення. Оптичну щільність 1,4-дінитрофенілгідрозонів, що утворилися реєструють на спектрофотометрі при довжині хвилі 370 нм.

Результати розраховують як оптичну щільність на мілілітр сироватки крові. Оптична щільність - умовна одиниця Од/мл., та при значеннях, вищих за 6,5 Од/мл роблять висновок про наявність аутоімунної реакції.

Для впровадження нововведення необхідна наступна апаратура:

центрифуга, спектрофотометр.

Нормальні значення коливаються в межах 4,5-6,5 Од/мл.

При значеннях більших, ніж 6,5 Од/мл у хворих можна визначити активацію аутоімунних реакцій.

Спосіб пояснюється наступними прикладами:

Приклад 1.

Хворий М., 50 років, діагноз: нейроциркуляторна дистонія без ішемічної хвороби серця.

По вищеописаному способу було проведено дослідження.

Отримані наступні результати: Оптична щільність розчину при довжині хвилі 370 нм - 0,400. Розрахунок $[0,400 : 0,1 \text{ мл}] = 4,0 \text{ Од/мл}$.

Кількість 1,4-дінитрофенілгідрозонів в сироватці крові становить 4,0 Од/мл.

Реакція бласттрансформації лімфоцитів до антигенів судин - 2 %.

Рівень аутоантитіл до окислених ліпопротеїдів низької щільності - 100 мОд/мл.

Реакція аутоенсибілізації відсутня.

Приклад 2.

Хворий К., 52 роки, діагноз: ішемічна хвороба серця, стенокардія напруження, атеросклероз.

Коронарографія зафіксувала атеросклеротичний стеноз коронарних артерій.

По вищеописаному способу було проведено дослідження.

Отримані наступні результати: Оптична щільність розчину при довжині хвилі 370 нм - 0,700. Розрахунок $[0,700 : 0,1 \text{ мл}] = 7,0 \text{ Од/мл}$.

Кількість 1,4-дінитрофенілгідрозонів в сироватці крові становить 7,0 Од/мл.

Реакція бласттрансформації лімфоцитів до антигенів судин - 7 %.

Рівень аутоантитіл до окислених ліпопротеїдів низької щільності -250 мОд/мл.

Зареєстрована реакція аутоенсибілізації по клітинному та гуморальному типу.

Приклад 3.

Хворий Г., 57 років, діагноз: ішемічна хвороба серця, стенокардія покою та напруження, атеросклероз.

Коронарографія зафіксувала атеросклеротичний стеноз коронарних артерій.

По вищеописаному способу було проведено дослідження.

Отримані наступні результати: Оптична щільність розчину при довжині хвилі 370 нм - 0,900. Розрахунок $[0,900 : 0,1 \text{ мл}] = 9,0 \text{ Од/мл}$.

Кількість 1,4-дінитрофенілгідрозонів в сироватці крові становить 9,0 Од/мл.

Реакція бласттрансформації лімфоцитів до антигенів судин - 10 %.

Рівень аутоантитіл до окислених ліпопротеїдів низької щільності - 290 мОд/мл.

Зареєстрована реакція аутоенсибілізації по клітинному та гуморальному типу.

Приклад 4.

Хворий Н., 61 рік, діагноз: ішемічна хвороба серця, стенокардія покою та напруження, атеросклероз, III функціональний клас.

Коронарографія зафіксувала атеросклеротичний стеноз коронарних артерій.

По вищеописаному способу було проведено дослідження.

Отримані наступні результати: Оптична щільність розчину при довжині хвилі 370 нм - 1,350. Розрахунок $[1,350 : 0,1 \text{ мл}] = 10,350 \text{ Од/мл}$.

Кількість 1,4-дінитрофенілгідрозонів в сироватці крові становить 10,350 Од/мл.

Реакція бласттрансформації лімфоцитів до антигенів судин - 17 %.

Рівень аутоантитіл до окислених ліпопротеїдів низької щільності -350 мОд/мл.

Зареєстрована реакція аутоенсибілізації по клітинному та гуморальному типу.