



УКРАЇНА

(19) UA (11) 55532 (13) U
(51) МПК (2009)
A61B 10/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ СТУПЕНЯ ЕНДОТЕЛІАЛЬНОЇ ДИСФУНКЦІЇ

1

(21) u201010144

(22) 17.08.2010

(24) 10.12.2010

(46) 10.12.2010, Бюл.№ 23, 2010 р.

(72) ПІСКОВАЦЬКИЙ ПАВЛО МИХАЙЛОВИЧ, РО-
МАНЧЕНКО МАКСИМ ІГОРЕВИЧ(73) ОДЕСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІ-
ВЕРСИТЕТ

(57) Спосіб визначення ступеня ендотеліальної дисфункції, що здійснюють шляхом підрахунку вільноциркулюючих клітин судинного ендотелію, який **відрізняється** тим, що по 1,0 мл плазми відібраної у хворого крові поміщують у дві пробірки, для осадження тромбоцитів додають розчин адреналіну 0,4 мл у концентрації 0,18 %, перемішують вміст пробірок упродовж 10-12 хвилин, центрифугують при 200g 15 хвилин, після чого відбирають по 1 мл безтромбоцитарної суміші з кожної пробірки і поміщують відібрану суміш у наступні дві пробірки, які центрифугують при 2000g упродовж 30 хвилин, далі надосадову суміш зливають, а у осад кожної пробірки додають по 0,2 мл 0,9 % розчину NaCl, ретельно перемішують, тричі заповнюють

2

вмістом кожної пробірки обидві сітки камери Горяєва, кожен раз підраховують кількість ендотеліальних клітин за допомогою фазово-контрастного мікроскопу, усереднюють усі отримані результати, потім обчислюють кількість клітин на 1 л крові хворого за формулою:

$$K = 3,16 \times N \times 10^5 \text{ клітин/л, де}$$

K - концентрація ендотеліальних клітин у крові пацієнта;

N - середнє арифметичне підрахунку ендотеліоцитів у 6 парах сіток камери Горяєва;

3,16 - постійний коефіцієнт, що враховує втрату клітин при розведенні крові хворого розчином цитрату Na та розчином адреналіну, концентрацію клітин при останньому центрифугуванні, співвідношення до об'єму камери Горяєва,

і при значенні концентрації K від $4,5 \times 10^5$ клітин/л до $6,5 \times 10^5$ клітин/л визначають помірну дисфункцію ендотелію, а при значенні його вище $6,5 \times 10^5$ клітин/л констатують ендотеліальну дисфункцію високого ступеня.

Корисна модель належить до області лабораторно-інструментальної діагностики, а саме до визначення ступеня ендотеліальної дисфункції, і може бути використана для оцінки порушення функціонального стану судинного ендотелію при серцево-судинній, ревматологічній та інших видах патології.

Згідно сучасної теорії розвитку атеросклерозу, патогенетичний процес починається саме з дисфункції ендотелію, тому раннє її виявлення може використовуватись для оцінки ступеня ураження ендотелію на доклінічній стадії патологічного процесу. В якості індикаторів подібних змін виступають такі біохімічні маркери, як ендотолін-1, фактор Віллебранда, молекули міжклітинної адгезії, тромбомодулін тощо. Та визначення цих факторів не є широко поширеним в клінічній практиці через високу вартість та ресурсоемність процедури. У той же час, визначення кількості десквамованих ендотеліальних клітин є досить доступним, дешевим і

може бути використано для прямої оцінки ступеня пошкодження ендотеліального шару судини.

Найбільш близьким до запропонованого технічного рішення є спосіб визначення вільноциркулюючих ендотеліальних клітин в крові [1], в якому в якості осаджувача тромбоцитів використовується адреналін.

Однак, вказаний метод не дозволяє з достатньою точністю оцінювати ступінь ендотеліальної дисфункції у зв'язку з низькою відтворюваністю результатів: похибка при проведенні парних проб складає близько 40-60%.

В основу корисної моделі поставлена задача вдосконалення способу за рахунок обчислення кількості клітин в 1л крові хворого за запропонованою формулою, що дасть можливість значно підвищити точність оцінки ступеня ендотеліальної дисфункції.

Поставлена задача вирішується тим, що, згідно корисної моделі, по 1,0мл плазми відібраної у хворого крові поміщують у дві пробірки, для оса-

(13) U

(11) 55532

(19) UA

дження тромбоцитів додають розчин адреналіну 0,4мл у концентрації 0,18%, перемішують вміст пробірок упродовж 10-12 хвилин, центрифугують при 200g 15 хвилин, після чого відбирають по 1мл безтромбоцитарної суміші з кожної пробірки і поміщують відібрану суміш у наступні дві пробірки, які центрифугують при 2000g упродовж 30 хвилин, далі над осадову суміш зливають, а у осад кожної пробірки додають по 0,2мл 0,9% розчину NaCl, ретельно перемішують, тричі заповнюють вмістом кожної пробірки обидві сітки камери Горяєва, кожен раз підраховують кількість ендотеліальних клітин за допомогою фазово-контрастного мікроскопу, усереднюють усі отримані результати, за формулою

$$K = 3,16 \times N \times 10^5 \text{ клітин/л,}$$

де:

K - концентрація ендотеліальних клітин у крові пацієнта;

N - середнє арифметичне підрахунку ендотеліоцитів у 6 парах сіток камери Горяєва;

3,16 - постійний коефіцієнт, що враховує втрату клітин при розведенні крові хворого розчином цитрату Na та розчином адреналіну, концентрацію клітин при останньому центрифугуванні, співвідношення до об'єму камери Горяєва, обчислюють кількість клітин на 1л крові хворого, і при значенні концентрації K від $4,5 \times 10^5$ клітин/л до $6,5 \times 10^5$ клітин/л визначають помірну дисфункцію ендотелію, а при значенні його вище $6,5 \times 10^5$ клітин/л констатують ендотеліальну дисфункцію високого ступеня.

Спосіб виконується наступним чином:

З ліктьової вени досліджуваного відбирають 4,5мл крові, яку змішують з 0,5мл 3,8% розчину цитрату Na, який виступає в ролі стабілізатора. Далі цитратну кров центрифугують при 200g упродовж 15 хвилин для осадження еритроцитів. У дві пробірки відбирають по 1мл отриманої плазми крові, після чого до кожної додають по 0,4мл 0,18% розчину адреналіну тартрату для індукції агрегації тромбоцитів. Вміст пробірок механічно перемішують періодичним струшуванням упродовж 10-12 хвилин. Для осадження агрегатів тромбоцитів пробірки центрифугують при 200g упродовж 15 хвилин. Далі з кожної з пробірок відбирають по 1мл безтромбоцитарної плазми, поміщають у окремі пробірки та центрифугують при 2000g упродовж 30 хвилин. Після цього над

осадову рідину зливають, а осад кожної з пробірок ресуспендують: додають 0,2мл 0,9% розчину NaCl та ретельно перемішують скляною паличкою упродовж однієї хвилини. Отриманою суспензією клітин тричі для кожної з пробірок заповнюють обидві сітки камери Горяєва, кожного разу підраховуючи кількість ендотеліальних клітин за допомогою фазово-контрастної мікроскопії. На фіг. показано мікроскопічну картину суспензії отриманого осаду у камері Горяєва. Далі знаходять середнє арифметичне з дванадцяти значень кількості ендотеліоцитів (по два на кожну камеру Горяєва, три заміри на пробірку, дві пробірки), та за допомогою формули

$$K = 3,16 \times N \times 10^5 \text{ клітин/л,}$$

де:

K - концентрація ендотеліальних клітин у крові пацієнта;

N - середнє арифметичне підрахунку ендотеліоцитів у 6 парах сіток камери Горяєва;

3,16 - постійний коефіцієнт, що враховує втрату клітин при розведенні крові хворого розчином цитрату Na та розчином адреналіну, концентрацію клітин при останньому центрифугуванні, співвідношення до об'єму камери Горяєва, обчислюють кількість ендотеліальних клітин на 1л крові хворого.

При значенні концентрації K від $2,0 \times 10^5$ клітин/л до $4,5 \times 10^5$ клітин/л дисфункцію вважають відсутньою, при значенні концентрації K від $4,5 \times 10^5$ клітин/л до $6,5 \times 10^5$ клітин/л визначають помірну дисфункцію ендотелію, а при значенні його вище $6,5 \times 10^5$ клітин/л констатують ендотеліальну дисфункцію високого ступеня.

В порівнянні з прототипом, заявлене технічне рішення дозволяє значно підвищити точність способу визначення ступеня ендотеліальної дисфункції шляхом використання запропонованої формули обчислення концентрації клітин в крові, що зменшує похибку відтворюваності результатів до 10-12%, тобто в 5-6 разів.

Джерела інформації:

1. Пат. 25012 Україна, МПК (2006) G01N 33/55 (2007. 07) G01N. опубл. 25. 07. 2007. - Бюл. № 11. - 2 с / Сівак В. В., Тимофієва Н. В., Динник О. Б. [та ін.]. Спосіб визначення вільно циркулюючих ендотеліальних клітин в крові - № U200702080. заявл. 27. 02. 2007.

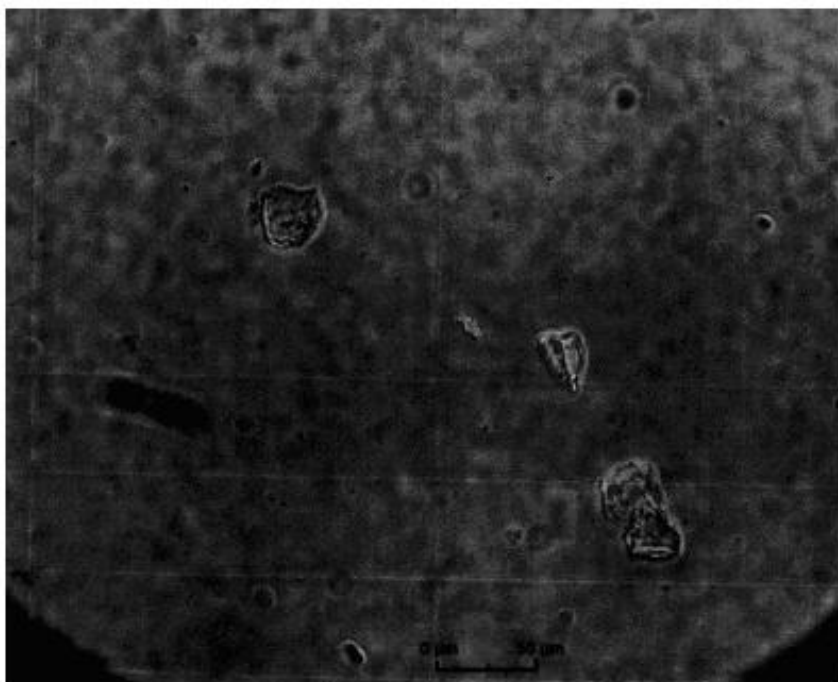


Fig.