



УКРАЇНА

(19) UA (11) 62292 (13) U
(51) МПК
G01N 33/48 (2006.01)
A61B 5/0205 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ РОЗВИТКУ ГЕМОРАГІЧНИХ УСКЛАДНЕНЬ АНТИКОАГУЛЯНТНОЇ ТЕРАПІЇ ГОСТРОГО ІНФАРКТУ МІОКАРДА ІЗ ЗУБЦЕМ Q

1

2

(21) u201100257

(22) 10.01.2011

(24) 25.08.2011

(46) 25.08.2011, Бюл.№ 16, 2011 р.

(72) КОВАЛЬ ОЛЕНА АКИНДИВНА, ІВАНОВ АНДРІЙ ПЕТРОВИЧ, МАРАРЕНКО ОЛЬГА АНАТОЛІВНА, ШЕВЦОВА АЛЛА ІВАНІВНА, ПЕЛЕШЕНКО ГАННА БОРИСІВНА, СКОРОМНАЯ АНАСТАСІЯ СЕРГІЙВНА

(73) ДНІПРОПЕТРОВСЬКА ДЕРЖАВНА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ

(57) Спосіб прогнозування розвитку геморагічних ускладнень антикоагулянтної терапії гострого ін-

фаркту міокарда із зубцем Q, що включає визначення у плазмі крові клітинного фібронектину та отримання додаткових показників ушкодження судинного ендотелію, який відрізняється тим, що на першу добу та 8 добу від початку хвороби досліджують ступінь фрагментованості фібронектину у плазмі крові хворих на гострий Q-інфаркт міокарда і при відсутності на першу добу субодиночі фібронектину з молекулярною масою 220 кДа та появи на 8 добу фрагментів фібронектину з молекулярною масою менше ніж 19 кДа діагностують високий ризик крововиливу при застосуванні тромболітичної терапії.

Корисна модель належить до медицини, а саме до кардіології, і може бути використана у клінічних умовах для індивідуального підбору антикоагулянтних лікарських препаратів та профілактики судинних катастроф у терапії хворих, зокрема хворих на гострий інфаркт міокарда.

Розвиток ускладнень гострих коронарних синдромів на тлі призначення антикоагулянтних препаратів у терапії цієї категорії хворих зумовлює необхідність розробки ефективних способів їх прогнозування та профілактики. Найбільш серйозною проблемою тромболітичної терапії у хворих на гострий інфаркт міокарда є високий ризик геморагічних ускладнень, частота яких складає у середньому 0,7 %, тому пошук нових додаткових факторів для оцінки безпечності й прогнозування клінічного ефекту від призначеного антитромбіного препарату є актуальною задачею.

Відомий спосіб прогнозування ризику виникнення геморагічних ускладнень у хворих на гостру ішемію мозку (інсульт), які отримували тромболітичну терапію препаратами, що є за механізмом дії тканинними активаторами плазміногену (Castellanos M, Leira R, ; Serena J., Blanco M, Pedraza S., Castillo J., Da'valos A. Plasma Cellular Fibronectin Concentration Predicts Hemorrhagic Transformation After Thrombolytic Therapy in Acute Ischemic Stroke // Stroke. - 2004. - Vol.35. - No 7. -

P.1671-1676). Метод базується на визначенні концентрації клітинного фібронектину у плазмі крові хворих на інсульт до початку тромболітичної терапії. Згідно з даним способом, концентрація клітинного фібронектину у плазмі крові, більша ніж 3,6 мкг/мл, свідчить про ризик виникнення геморагічних ускладнень у цих пацієнтів після застосування тканинних активаторів плазміногену. За результатами досліджень підвищення концентрації клітинного фібронектину в плазмі крові цих пацієнтів обумовлено його надходженням із ушкодженого ендотелію судин головного мозку. Недоліком цього методу є обмеженість його використання, оскільки він має прогностичне значення лише у хворих на інсульт.

Найбільш близьким до запропонованого способу прогнозування геморагічних ускладнень антикоагулянтної терапії гострого інфаркту міокарда із зубцем Q є визначення клітинного фібронектину (Cornelius Diamond. Cellular fibronectin as a diagnostic marker in cardiovascular disease and methods of use thereof// Patent Application Publication/ - No:US2008/0010024A1, Jan.2008), що включає оцінку кількості клітинного фібронектину з використанням тест-системи фірми BioHit (Finland). Якщо рівень клітинного фібронектину перевищує 5,8 мкг/л, проводять додаткові дослідження одного або декількох інших біохімічних

(19) UA (11) 62292 (13) U

маркерів ушкодження судинного ендотелію, тромбоза або апоптоза, за результатами яких верифікують остаточний діагноз та обирають відповідну терапію. Недоліками прототипа, що можуть перешкоджати досягненню очікуваного технологічного результату є: необхідність отримання додаткових біохімічних показників для остаточного діагнозу, що збільшує тривалість аналізу та знижує прогностичну значущість методу.

В основу корисної моделі поставлена задача розробки специфічного та високочутливого способу оцінки ризику крововиливів у хворих на гострий інфаркт міокарду із зубцем Q, що отримують тромболітичну терапію.

Поставлена задача вирішується тим, що у запропонованому способі прогнозування розвитку геморагічних ускладнень антикоагулянтної терапії гострого інфаркту міокарда із зубцем Q, що включає визначення у плазмі крові клітинного фібронектину та отримання додаткових показників ушкодження судинного ендотелію, згідно з корисною моделлю на першу та 8 добу від початку хвороби досліджують ступінь фрагментованості фібронектину у плазмі крові хворих на гострий Q-інфаркт міокарда і при відсутності на першу добу субдодиниці фібронектину з молекулярною масою 220 кДа та появи на 8 добу фрагментів фібронектину з молекулярною масою менше ніж 19 кДа діагностується високий ризик крововиливу при застосуванні тромболітичної терапії.

Корисну модель, що заявляють, здійснюють таким чином:

1. Проводять електрофорез зразків плазми крові за методом Леммлі в 7,5 % поліакріламідному гелі (ПААГ) у присутності додецилсульфату натрію. До 10 мкл плазми крові додають 20 мкл ЗФР. Для аналізу беруть 10 мкл розведеної у 3 рази плазми крові хворих на гострий QIM та 10 мкл буферного розчину, що містить трис-HCl-0,4M, додецилсульфат натрію - 5 %, дитіотрейтол - 2 %, гліцерин - 30 % і бромфеноловий синій - 0,001 %. Проби кип'ятять 4 хвилини і вносять у лунки гелю. Як електродний буфер використовують розчин, що містить: трис - 0,025M, гліцин - 0,192M та додецилсульфат натрію - 0,1 %. Концентрування проб проводять при силі струму 12 mA, розділення білкових фракцій - при силі струму 35 mA.

2. Після закінчення електрофорезу здійснюють перенесення білків на нітроцелюлозну мембрану фірми Sigma (США) при силі струму 260 mA протягом 2 годин, використовуючи як електродний буфер розчин, що містить: трис - 0,025 M, гліцин - 0,192 M та етанол - 20 %.

3. Виявлення фрагментів фібронектину проводять за наступними етапами: витримують мембрани у забуференому фізіологічному розчині, що містить 1 % сухе молоко, потім промивають 3 рази по 10 хвилин 0,05 % твін-фосфатним буфером (ТФБ), інкубують впродовж 3 годин у ТФБ, що містить кролячі антитіла до ФН плазми крові людини, знову промивають 3 рази по 10 хвилин розчином ТФБ, інкубують мембрани впродовж 2 годин у ТФБ, що містить кон'юговані з пероксидазою кореню хрому антитіла до IgG кроля, промивають 3 рази ТФБ, відтворюють ферментативне фарбу-

вання за допомогою діамінобензідіну та зупиняють реакцію шляхом перенесення мембрани у дистильовану воду. Для визначення молекулярних мас поліпептидних фрагментів фібронектину використовують кольорові стандарти з діапазоном молекулярних мас від 250 до 14,5 кДа фірми BioRad (США). Як негативний та позитивний контроль для ФН плазми крові людини використовують відповідні стандарти з тест-набору ІФА-ФН фірми НВО Іммунотех (Росія, Москва).

4. Реєстрацію результатів та обчислення молекулярних мас фрагментів фібронектину проводять за допомогою програми "GEL-Pro".

Дослідження корисної моделі, що пропонується, проведені на базі кафедри госпітальної терапії №2 і кафедри біохімії, медичної та фармацевтичної хімії Дніпропетровської державної медичної академії у 64 хворих на ішемічну хворобу серця (ІХС), серед яких 40 чоловіків та 24 жінки. Для порівняння використовували кров 15 здорових добровольців. Відтворюваність дослідження склала 94,9 %.

Можливість здійснення запропонованої корисної моделі підтверджується прикладами.

Приклад №1

Хворий Б., 74 роки, історія хвороби №9951.

Був прийнятий до реанімаційного відділення Клінічного об'єднання швидкої медичної допомоги м. Дніпропетровська з діагнозом ІХС: гострий інфаркт міокарду із зубцем Q нижніх відділів передньо-перетинкової ділянки, верхівки, бокової стінки лівого шлуночка. Гіпертонічна хвороба III ступеня. СН II А ст. NYHA II ФК. Діагноз гострого інфаркту верифіковано на підставі виникнення ангінозного епізоду, що супроводжувався ішемічними змінами ЕКГ і підвищенням рівня МВ-КФК. Хворий отримував стандартну терапію, у тому числі фібринолітичну та антитромбінову.

Згідно з корисною моделлю у хворого визначили фрагментованість фібронектину плазми крові при надходженні, на 8 добу (закінчення антитромбінової терапії) і 21 добу (закінчення госпітального періоду). За результатами аналізу у даного хворого були відсутні фрагменти фібронектину з молекулярною масою 220 кДа в першу добу. На 8 добу цей фрагмент з'являвся та одночасно було виявлено нові фрагменти фібронектину з молекулярною масою менше 19 кДа, кількість яких зростала до 21 доби.

На першу добу у хворого розвинулась кровотеча з ясен, віднесена до легкої за TIMI hemorrhage classification. На 8 добу ці ознаки зникли.

Приклад №2

Хвора П., 58 років, історія хвороби №71318

Була прийнята у відділення реанімації Клінічного об'єднання швидкої медичної допомоги м. Дніпропетровська з діагнозом ІХС: гострий інфаркт міокарда із зубцем Q передньо-перегородочної ділянки, верхівки, бокової стінки лівого шлуночка. СН I ст. NYHA II ФК зі збереженою систолічною функцією ЛШ.

Діагноз гострого інфаркту верифіковано на підставі виникнення ангінозного епізоду, що супроводжувався ішемічними змінами ЕКГ і підвищенням

рівня МВ-КФК. Хвора отримувала стандартну терапію.

Згідно з корисною моделлю у хворой визначали фрагментованість фібрoneктину плазми крові при надходженні (перша доба), на 8 добу (закінчення антитромбінової терапії), на 21 добу (закінчення госпітального періоду). У хворой були відсутні фрагменти фібрoneктину з молекулярною масою 220 кДа в першу добу. На 8 добу відзначалась поява фрагментів фібрoneктину з молекулярною масою 220 кДа та низькомолекулярних фрагментів з розміром менше 19 кДа, кількість яких зростала до 21 доби.

На 4 добу перебування в стаціонарі у жінки з'явилися множинні підшкірні крововиливи розміром від 1 см у діаметрі до 3-4 см та 15-20 см, що віднесені до легких за TIMI hemorrhage classification.

Приклад №3

Хворий Р., 58 років, історія хвороби №2002.

Був прийнятий до реанімаційного відділення Клінічного об'єднання швидкої медичної допомоги м. Дніпропетровська з діагнозом ІХС: гострий інфаркт міокарду із зубцем Q нижніх відділів лівого шлуночку. СН І ст. NYHA II ФК.

Діагноз гострого інфаркту верифіковано на підставі виникнення ангінозного епізоду, що супроводжувався ішемічними змінами ЕКГ і підвищенням рівня МВ-КФК. Хворий отримував стандартну терапію.

Згідно з корисною моделлю у хворого визначили фрагментованість фібрoneктину плазми крові на 1,8 та 21 добу. У даного хворого виявили відсутність фрагментів фібрoneктину з молекулярною масою 220 кДа в першу добу, на 8 добу визначались фрагменти фібрoneктину з молекулярною

вагою 220 кДа та менше ніж 19 кДа. Кількість останніх підвищувалась на 21 добу. На 4 добу перебування в стаціонарі у хворого розвинулась шлунково-кишкова кровотеча, що віднесена до помірних за TIMI hemorrhage classification.

Наведені приклади свідчать, що відсутність в першу добу захворювання нативної субодиноці фібрoneктину з молекулярною масою 220 кДа та поява з 8 доби захворювання фрагментів фібрoneктину з молекулярною масою нижче 19 кДа є прогностичним фактором розвитку кровотечі вже з першої доби у госпітальному та післягоспітальному періоді захворювання у хворих з гострим інфарктом міокарду із зубцем Q.

Запропонований спосіб прогнозування розвитку геморагічних ускладнень антикоагулянтної терапії гострого інфаркту міокарда із зубцем Q характеризується високою чутливістю та специфічністю і може бути використаний в кардіологічних відділеннях і клінічних лабораторіях.

Технічний результат, що досягається при використанні корисної моделі, визначається дослідженням ступеня деградації фібрoneктину, який, в свою чергу, залежить від активності протеолітичних процесів у екстрацелюлярному матриксі та судинному руслі і відображає ступінь ураження судин та тромбоутворення. Застосування корисної моделі дозволить зменшити ризик виникнення кровотеч при використанні тромболітичних препаратів.

Розроблений спосіб відповідає умові "промислова придатність", що дозволяє кваліфікувати його як "корисну модель", яка може бути використана у лабораторній діагностиці гострого інфаркту міокарда та моніторингу ефективності терапевтичних засобів.