



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 71717

(13) A

(51) 7 A61K35/16

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ АТЕРОГЕННОГО ПОТЕНЦІАЛУ КРОВІ

1

2

(21) 2003098633

(22) 22.09.2003

(24) 15.12.2004

(46) 15.12.2004, Бюл. № 12, 2004 р.

(72) Мхітарян Лаура Сократівна, Євстратова Ірина
Никифорівна, Василичук Наталія Миколаївна,
Гуляницька Ірина Петрівна(73) ІНСТИТУТ КАРДІОЛОГІЇ ІМ. АКАД.
М.Д.СТРАЖЕСКА АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК
УКРАЇНИ

(57) Спосіб визначення атерогенного потенціалу крові, що включає взяття 5мл крові, отримання сироватки, напластовування фізіологічного розчину, центрифугування, видалення сироватки з-під сольового шару, додавання до неї преципітанту, визначення оптичної щільності отриманої суміші, центрифугування, видалення надосадної рідини, отримання сумарної фракції ліпопротеїдів низької та дуже низької щільності (атерогенних ліпопротеїдів) та розрахунок результатів, який **відрізняється** тим, що фенілгідразони визначаються в атерогенних ліпопротеїдах, для чого на отриману сироватку напластовують 0,6мл фізіологічного розчину, центрифугують 15 хвилин при 8000g, визначають оптичну щільність виділеної з-під сольового розчину сироватки і додають до неї преципітант у співвідношенні 1:10, визначають оптичну щільність отриманого розчину, через 10-15 хвилин

центрифугують 15-20 хвилин при 4000g, зливають надосадну рідину, отримують осад, що складається з сумарної фракції атерогенних ліпопротеїдів, додають до осаду об'єм (1мл), що дорівнює 0,1М 2,4-ДФГ (2,4-динітрофенілгідазин, який попередньо розчинено в 2Н НС1 і етиловому спирті, і утримують в киплячій бані до повного розчинення 2,4-ДФГ), інкубацію здійснюють при кімнатній температурі протягом 1год., проби центрифугують при 6000g протягом 15-20хв., осад промивають три рази розчином етанол - етилацетат (1:1), центрифугують при 6000g протягом 15-20хв., для екстракції ліпідів і 2,4-ДФГ, отриманий осад підсушують для усунення розчинника етанол-етилацетату і розчиняють в 8М розчині сечовини, сечовину додають до осаду в об'ємі 4мл і утримують в киплячій бані протягом 5хв. до повного розчинення, оптичну щільність фенілгідразонів (X1), що утворилися, реєструють на спектрофотометрі при довжині хвилі 370nm, результат визначення фенілгідразонів дають в одиницях екстинції на оптичну щільність ліпопротеїдів низької та дуже низької щільності:

X1/D1,

де X1 - оптична щільність фенілгідразонів;

D1 - оптична щільність ліпопротеїдів низької і дуже низької щільності.

Винахід стосується медицини та біології, та може бути використаний для визначення атерогенного потенціалу крові, що має значення для діагностики розвитку та прогресування ішемічної хвороби серця (коронарного атеросклерозу).

Відомим є спосіб визначення атерогенного потенціалу крові (див. "Лабораторные методы для дифференцированного назначения и оценки эффектов противоатеросклеротических средств", О.Н. Воскресенский, В.А. Туманов, Ангиопротекторы, 1982, с.94-96), який полягає в тому, що з 10мл крові, взятої натщесерце отримують 5мл сироватки, на яку шприцем напластовують фізіологічний розчин в кількості 1,4мл. Потім центрифугують 10хв. при 10000g. Сироватку шприцом відсмокту-

ють з-під сольового шару та вимірюють в ній сумарну кількість ліпопротеїдів низької та дуже низької щільності. Таким чином до 4мл 0,025М розчину CaCl₂ (преципітант) додавають 0,4мл сироватки та визначають оптичну щільність на ФЕК в кюветі 0,5см при 700nm проти води. Потім додавають 0,08мл 1% розчину гепарину, суміш перемішують та через 4 хвилини визначають оптичну щільність в тих же умовах. Вміст кювет після визначення центрифугують при 1500g 10 хвилин. Видаляють надосадну рідину, а осад розчиняють в 3мл 5% NaCl. Оптичну щільність вимірюють на спектрофотометрі (232nm, кювета 1см) проти води. Вміст гідроперекисів ліпідів дають в одиницях екстинції

(13) A

(11) 71717

(19) UA

на мілілітр сироватки крові або на кількість ліпопротеїдів низької та дуже низької щільності.

Кількість гідроперекисів ліпідів низької та дуже низької щільності оцінюють згідно того, що в нормі вміст гідроперекисів ліпідів в ліпопротеїдах низької та дуже низької щільності є 1,08-5,40 Д232/мл крові, в той час, коли у хворих на прогресуючий атеросклероз цей показник вищий за 5,40 Д232/мл крові.

Однак цьому способу притаманні такі недоліки: по-перше, використовується значна кількість сироватки крові; по-друге, визначається вміст тільки гідроперекисів ліпідів без урахування змін ліпопротеїдної молекули в цілому, проте як останнє відіграє важливу роль в придбанні ліпопротеїдами атерогенних властивостей. Дані обставини ведуть до зниження точності, та тим самим до зниження ефективності діагностики та лікування ішемічної хвороби серця.

Найбільш близьким по технічній суті способу, що пропонується є спосіб "Метод определения окислительной модификации белков сыворотки крови человека (см. статью Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А., Порохов И.Г. Вопросы медицинской химии, М., Медицина, 1995г., С.24-26.)", що полягає в тому, що для аналізу використовують 0,1мл сироватки крові людини. Осадження білків сироватки крові здійснюється за допомогою (0,9мл) 20% розчину трихлороцтової кислоти (ТХО). До денатурованих білків додають рівний об'єм (1мл) 0,1М 2,4-ДФГ (2,4-дінитрофенілгідрозин), який розчинено в 2Н НСІ і етиловому спирті, і утримують в киплячій бані до повного розчинення 2,4-ДФГ. В контрольну пробу додають замість 2,4-ДФГ рівний об'єм 2Н НСІ. Інкубацію здійснюють при кімнатній температурі протягом 1г. Потім проби центрифугують при 6000g протягом 15-20хв. Осад промивають 3 рази розчином етанол-етилацетат (1:1), центрифугують при 6000g протягом 15-20хв., для екстракції ліпідів і 2,4-ДФГ, який не реагував з карбонільними групами окислених білків. Отриманий осад підсушують з метою усунення розчинника етанол-етилацетату і розчиняють в 8М розчині сечовини. Сечовину додають до осаду в об'ємі 4мл і утримують в киплячій бані протягом 5хв. до повного розчинення. Оптичну щільність дінитрофенілгідрозинів, що утворилися, реєструють на спектрофотометрі при довжині хвилі 370нм.

Результат визначення фенілгідрозонів дають в одиницях екстинції на мл сироватки крові. Кількість фенілгідрозонів оцінюють згідно того, що в нормі вміст цього показника в крові людини є 3,5-5,5 Д370/мл крові, в той час, коли у хворих на прогресуючий атеросклероз цей показник вищий за 5,5 Д370/мл крові.

Однак цьому способу притаманні наступні недоліки: цей спосіб не є специфічним для визначення атерогенного потенціалу крові, тому, що визначається загальний вміст продуктів вільнорадикального окислення білків сироватки крові - фенілгідрозонів, який залежить від цілого ряду різних патологічних чинників і притаманний багатьом захворюванням. Дані обставини ведуть до зниження точності, та тим самим до зниження ефективності

діагностики та лікування прогресуючого атеросклерозу.

В основу винаходу поставлене завдання розробки способу визначення атерогенного потенціалу крові, в якому шляхом зміни дій, режимів та застосовуваних речовин забезпечується зменшення використання сироватки крові та підвищення специфічності та точності визначення атерогенного потенціалу крові.

Для цього спосіб передбачає отримання з 2мл сироватки крові осаду, який містить ліпопротеїди низької та дуже низької щільності, тобто атерогенні ліпопротеїди, і в цьому осаді визначення кількості модифікованих вільнорадикальними процесами білків - фенілгідрозонів. Новим в способі є те, що фенілгідрозони визначаються в атерогенних ліпопротеїдах низької та дуже низької щільності, внаслідок чого підвищується специфічність, точність діагностики і тим самим - ефективність лікування хворих на ішемічну хворобу серця (коронарний атеросклероз).

Спосіб пояснюється наступним чином:

З 5мл крові, взятої натщесерце, отримують 2мл сироватки, на яку шприцем напластовують 0,6мл фізіологічного розчину та центрифугують 15хв. при 8000g. Сироватку обережно шприцем видаляють з-під сільового шару та в ній визначають кількість ліпопротеїдів низької та дуже низької щільності. Для цього вимірюють оптичну щільність сироватки при довжині хвилі 700нм в кюветі 0,5см проти води (д1). Додають до неї преципітант, наприклад фірми "Comau", у співвідношенні 1:10, та через 4 хвилини визначають оптичну щільність в тих же умовах проти води (д2). Різниця д2-д1 (Д1) визначає оптичну щільність ліпопротеїдів низької та дуже низької щільності. Потім вимірюваний розчин центрифугують 15 хвилин при 4000g. Надосадну рідину зливають. В осад додають рівний об'єм (1мл) 0,1М 2,4-ДФГ (2,4-дінитрофенілгідрозин, який розчинено в 2Н НСІ і етиловому спирті, і утримують в киплячій бані до повного розчинення 2,4-ДФГ). В контрольну пробу додають замість 2,4-ДФГ рівний об'єм 2Н НСІ. Інкубацію здійснюють при кімнатній температурі протягом 1г. Потім проби центрифугують при 6000g протягом 15-20хв. Осад промивають три рази розчином етанол-етилацетат (1:1), центрифугують при 6000g протягом 15-20хв., для екстракції ліпідів і 2,4-ДФГ, який не реагував з карбонільними групами окислених білків. Отриманий осад підсушують з метою усунення розчинника етанол-етилацетату і розчиняють в 8М розчині сечовини. Сечовину додають до осаду в об'ємі 4мл і утримують в киплячій бані протягом 5хв. до повного розчинення. Оптичну щільність дінитрофенілгідрозонів (Х1), що утворилися, реєструють на спектрофотометрі при довжині хвилі 370нм.

Результат визначення фенілгідрозонів дають в одиницях екстинції на оптичну щільність ліпопротеїдів низької та дуже низької щільності.

Х1/Д1

де:

Х1 - оптична щільність фенілгідрозонів;

Д1 - оптична щільність ліпопротеїдів низької та дуже низької щільності.

Кількість фенілгидразонів оцінюють згідно того, що в нормі вміст цього показника в крові людини є 0,35-0,65 ДЗ70/оптичну щільність ліпопротеїдів низької та дуже низької щільності, або умовних одиниць в той час, коли у хворих на ішемічну хворобу серця з прогресуючим перебігом цей показник вищий за 0,65 умовних одиниць.

Спосіб пояснюється наступними прикладами:

Приклад 1

Хворий С., 53 роки, діагноз: ішемічна хвороба серця, стенокардія напругу, атеросклероз.

Коронарографія зафіксувала атеросклеротичний стеноз коронарних артерій без подальшого прогресування.

По вищеописаному способу було проведено дослідження. Отримані наступні результати: X1 - 0,51 ум. од., Д1 - 1,22 ум. од.

Розрахунок: $[0,51:1,22]=0,42$ ум. од.

Вміст фенілгидразонів - 0,42, що становить норму.

Приклад 2

Хворий З., 50 років, діагноз: ішемічна хвороба серця, стенокардія напругу, атеросклероз.

Коронарографія зафіксувала атеросклеротичний стеноз коронарних артерій, що має тенденцію до збільшення.

По вищеописаному способу було проведено дослідження. Отримані наступні результати: X1 - 0,91 ум. од., Д1 - 1,24 ум. од.

Розрахунок: $[0,91:1,24]=0,73$ ум. од.

Вміст фенілгидразонів - 0,73, що є показником підвищеного атерогенного потенціалу крові, що може призводити до прогресуючого перебігу ішемічної хвороби серця.

Приклад 3

Хворий Д., 55 років, діагноз: ішемічна хвороба серця, стенокардія напругу, атеросклероз.

Коронарографія зафіксувала атеросклеротичний стеноз коронарних артерій, що прогресує.

По вищеописаному способу було проведено дослідження. Отримані наступні результати: X1 - 1,81 ум. од., Д1 - 1,35 ум. од.

Розрахунок: $[1,81:1,35]=1,34$ ум. од.

Вміст фенілгидразонів - 1,34, що є показником значно підвищеного атерогенного потенціалу крові, що напевно призводить до прогресуючого перебігу ішемічної хвороби серця.

Треба підкреслити, що коронарографічні дослідження є травматичні та небезпечні для пацієнтів, і показані до використання не всім хворим на прогресуючий атеросклероз. Так протипоказання для цієї процедури мають хворі з значною гіпертрофією міокарду, з стенокардією IV функціонального класу, зі значною серцевою недостатністю та недостатністю кровообігу, а також з тяжкими порушеннями серцевого ритму та ін.

На порівняння з прототипом, запропонований спосіб дозволяє підвищити точність діагностики за рахунок того, що продукти вільнорадикального окислення білків визначаються саме в атерогенних ліпопротеїдах, перекисна модифікація яких надає їм атерогенних властивостей та сприяє їх вбудову в коронарні судини, що призводить до прогресування ішемічної хвороби серця (коронарного атеросклерозу). Таким чином точність діагностики атерогенного потенціалу крові сприяє підвищенню ефективності лікування хворих на ішемічну хворобу серця.