



УКРАЇНА

(19) UA (11) 71737 (13) A
(51) 7 A61K31/215МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту(54) ПРОЦЕС ВИЗНАЧЕННЯ СТУПЕНЯ ТЯЖКОСТІ СЕРЦЕВОЇ НЕДОСТАТНОСТІ У ХВОРИХ НА СЕРЦЕ-
ВО-СУДИННУ ПАТОЛОГІЮ

1

2

(21) 20031110533

(22) 21.11.2003

(24) 15.12.2004

(46) 15.12.2004, Бюл. № 12, 2004 р.

(72) Євстратова Ірина Никифорівна, Ліпкан Наїра
Георгіївна, Мхітарян Лаура Сократівна, Орлова
Ніна Миколаївна, Дроботько Тетяна Федорівна
(73) ІНСТИТУТ КАРДІОЛОГІЇ ІМ. АКАД. М.Д.
СТРАЖЕСКА АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇ-
НИ(57) 1. Процес визначення ступеня тяжкості серце-
вої недостатності у хворих на серцево-судинну
патологію, що включає відбір проби 2мл крові, з
якої отримують сироватку, визначення в 0,1мл
сироватки крові вмісту кінцевого продукту NO-
синтазної реакції, використання як показника тяж-
кості серцевої недостатності у хворих на серцево-
судинну патологію вмісту кінцевого продукту NO-
синтазної реакції, який **відрізняється** тим, що як
показник тяжкості серцевої недостатності застосо-
вують вміст цитруліну, при цьому при вмісті цитру-
ліну 50,5-70,5мкмоль/л, роблять висновок про на-
явність серцевої недостатності першого ступеня,
при вмісті цитруліну 70,6-80,5мкмоль/л, роблять
висновок про наявність серцевої недостатності
другого ступеня А (С_{IIa}), 80,6-100,5мкмоль/л -
роблять висновок про наявність серцевої недоста-
тності другого ступеня В (С_{IIa}), при вмісті цитрулі-ну, який вищий за 100,5мкмоль/л, роблять висно-
вок про наявність серцевої недостатності третього
ступеня.2. Процес визначення ступеня тяжкості серцевої
недостатності за п.1, який **відрізняється** тим, що
після відбору проби крові з неї отримують сироват-
ку, до 0,1мл якої додають 0,9мл фізіологічного
розчину, проводять депротейнізацію додаванням
0,2мл 2N HClO₄, суміш центрифугують при 10000g
протягом 10хв., до 0,4мл супернатанту додають
2мл реагенту (1мл 59mM diacetylmonoxim+ 1ml
32mM antipyrine+55mM ferric sulfate in 6M H₂SO₄),
киплять протягом 15хв. на водяній бані і після
охолодження визначають величину екстинції на
спектрофотометрі при довжині хвилі 465nm, в кон-
трольну пробу додають 0,1мл фізіологічного роз-
чину, в стандартну пробу додають 0,1мл 100мкМ
розчин цитруліну, вміст цитруліну розраховують по
формулі:

$$D = \frac{A \cdot C \text{ мкмоль/л}}{B}, \text{ де}$$

А - показник екстинції сироватки крові,

В - показник екстинції стандарту,

С - вміст цитруліну в стандартній пробі -
100мкмоль/л,

D - вміст цитруліну в пробі.

Винахід стосується медицини та біології, та
може бути використаний для оцінки ступеню тяж-
кості серцевої недостатності, що має значення для
діагностики та лікування хворих на серцево-
судинну патологію.В клініці серцеву недостатність діагностують
за допомогою спеціальної апаратури: електрокар-
діограми, ехокардіограми та ін.Відомим є процес оцінки тяжкості серцевої не-
достатності за визначенням стану судинного ендотелію шляхом імуноферментного аналізу, який
виконується за допомогою готових тест-систем
"Bioprobe BW", або ін.Цей процес має цілий ряд недоліків: готові
тест-системи потребують великих грошових ви-
трат, всі ці речовини короткоживучі (період напів-
розкладу кілька секунд), окрім того кінцевий етап
виконання цього процесу потребує наявності
складної апаратури - проточного цитофлуоримет-
ра, системи для імуноферментного аналізу, сте-
рильного боксу та спеціальний штат працівників.Найбільш близьким по технічній суті процесу,
що пропонується є процес визначення вмісту ніт-
рит-аніону (показника вмісту оксида азоту) в сиро-
ватці крові (Green L.S., Wagner D.A. Glogowski J. et
al. Analysis of Nitrate, Nitrite, And [15N] Nitrate in
Biological Fluids) в якому з 5мл крові отримують

(13) A

(11) 71737

(19) UA

2мл сироватки, до неї додають 0,5мл розчину $\text{Ba}(\text{OH})_2$ та 0,2мл 20% розчину ZnSO_4 , перемішують скляною паличкою та центрифугують на протязі 10 хвилин при 6000 оборотах на хвилину, відбирають надосадну рідину. 1мл надосадної рідини заливають в кадмієву колонку та додають 0,25мл аміачного буфера ($\text{pH}=9,8$) та 0,75мл дистильованої води. Рідина може стати каламутною. Колонки з рідиною вміщують в апарат для струшування та залишають на 45 хвилин. Розчин повністю зливають з колонки та додають до нього 0,6мл Реактива Гріса, залишають на 30-40 хвилин. Оптичну щільність отриманого розчину вимірюють на спектрофотометрі при 540нм в кюветі 1см. В якості стандартного розчину використовують розчин нітрита натрію. Після використання кадмієвої колонки ретельно двічі промивають етиловим спиртом, потім дистильованою водою та заливають 0,1N розчином соляної кислоти.

Цей процес має наступні недоліки: він потребує використання багатьох дорогих реагентів, окрім того, вміст нітрит-аніону залежить від багатьох екзогенних чинників, таких, як продукти харчування, що містять нітрити, якості води, повітря, застосування лікарських засобів, що містять сполуки азоту. Нітрит-аніон є нестійким продуктом NO-синтазної реакції (період існування до 30 секунд), який схильний до подальших перетворень. Це знижує точність визначення, а тим самим ефективність лікування хворих на серцево-судинну патологію, що мають синдром серцевої недостатності.

В основу винаходу поставлене завдання розробки процесу визначення ступеню тяжкості серцевої недостатності, в якому шляхом зміни дій, режимів та застосовуваних речовин забезпечується зменшення використання сироватки крові та підвищення специфічності та точності оцінки ступеню тяжкості серцевої недостатності і, тим самим, підвищення ефективності діагностики та лікування хворих на серцево-судинну патологію, що мають синдром серцевої недостатності.

Для цього процес передбачає визначення в 0,1мл сироватки крові вмісту кінцевого продукту NO-синтазної реакції.

Новим в процесі є те, що для оцінки ступеню тяжкості серцевої недостатності в якому в якості показника використовують показник вмісту цитруліну, при цьому при вмісту цитруліну 50,1-80,5мкмоль/л, роблять висновок про наявність серцевої недостатності першого ступеню, а при вмісту цитруліну 80,5-100,1мкмоль/л, роблять висновок про наявність серцевої недостатності другого ступеню.

Застосування нового показника, який відрізняється значною стійкістю і незалежністю від різного роду ендогенних та екзогенних чинників (характер харчування, застосовані медичні препарати, що містять сполуки азоту тощо) дозволяє підвищити точність діагностики, а також забезпечити економію досліджуваного матеріалу що забезпечує підвищення ефективності лікування хворих на серцево-судинну патологію.

В конкретних варіантах застосування показника вмісту цитруліну в процесі здійснюють таким чином. Після взяття проби крові з неї отримують

сироватку, до 0,1мл якої додають 0,9мл фізіологічного розчину, проводять депротеїнізацію додаванням 0,2мл 2N HClO_4 , суміш центрифугують при 10000g на протязі 10хв., до 0,4мл супернатанту додають 2мл реагенту (1мл 59mM diacetylmonoxim+1ml 32mM antipyrine+55mM ferric sulfate in 6M H_2SO_4), кип'ятять протягом 15хв. на водяній бані і після охолодження визначають величину екстинції на спектрофотометрі при довжині хвилі 465нм., в контрольну пробу додають 0,1мл фізіологічного розчину, в стандартну пробу додають 0,1мл 100мкм розчин цитруліну, вміст цитруліну розраховують по формулі:

$$D = \frac{A \times C \text{ мкмоль/л}}{B}$$

A - показник екстинції сироватки крові;

B - показник екстинції стандарту;

C - вміст цитруліну в стандартній пробі - 100мкмоль/л;

D - вміст цитруліну в пробі.

Кількість цитруліну в сироватці крові оцінюють згідно того, що в нормі вміст цього показника в крові людини є 20,1-50,1мкмоль/л в той час, коли у хворих на серцево-судинну патологію з синдромом серцевої недостатності цей показник вищий за 50,1мкмоль/л.

Процес пояснюється наступними прикладами:

Приклад 1

Хворий В. 45 років, діагноз: Ішемічна хвороба серця, стенокардія напруження, функціональний клас II, CH_0 (серцева недостатність відсутня).

По вищеописаному процесу було проведено дослідження.

Отримані наступні результати: A - 0,398; B - 0,866.

Розрахунок:

$[0,398; 0,866] \cdot 100 \text{ мкмоль/л} = 40,6 \text{ мкмоль/л}$.

Вміст цитруліну в сироватці крові є 40,6мкмоль/л, що є показником норми.

Приклад 2

Хворий Д. 55 років, діагноз: Ішемічна хвороба серця, стенокардія напруження, функціональний клас III, атеросклеротичний кардіосклероз, CH_1 .

По вищеописаному процесу було проведено дослідження.

Отримані наступні результати: A - 0,492; B - 0,866.

Розрахунок:

$[0,492; 0,866] \cdot 100 \text{ мкмоль/л} = 50,7 \text{ мкмоль/л}$.

Вміст цитруліну в сироватці крові є 50,7мкмоль/л, що є показником незначного перевищення норми.

Приклад 3

Хворий Б. 51 рік, діагноз: Ішемічна хвороба серця, стенокардія напруження, кардіосклероз, CH_{IIa} .

По вищеописаному процесу було проведено дослідження.

Отримані наступні результати: A - 0,619; B - 0,866

Розрахунок:

$[0,619; 0,866] \cdot 100 \text{ мкмоль/л} = 71,5 \text{ мкмоль/л}$.

Вміст цитруліну в сироватці крові є 71,5мкмоль/л, що є показником перевищення норми і вищим за такий у хворого з CH_1 .

Приклад 4

Хворий С. 52 роки, діагноз: Ішемічна хвороба серця, стенокардія напругу, функціональний клас III, кардіосклероз СН_{IIa}.

По вищеописаному процесу було проведено дослідження.

Отримані наступні результати: А - 0,802; В - 0,915.

Розрахунок:

[0,802:0,915]-100мкмоль/л=87,7мкмоль/л.

Вміст цитруліну в сироватці крові є 87,7мкмоль/л, що є показником перевищення норми і вищим за такий у хворого з СН_I і СН_{IIa}.

Приклад 5

Хворий С. 56 років, діагноз: Ішемічна хвороба серця, нестабільна стенокардія, ФК-III, кардіосклероз, СН_{IIa}.

По вищеописаному процесу було проведено дослідження.

Отримані наступні результати: А - 0,813; В - 0,915.

Розрахунок:

[0,813:0,915]-100мкмоль/л=88,9мкмоль/л.

Вміст цитруліну в сироватці крові є 88,9мкмоль/л, що є показником перевищення норми і вищим за такий у хворого з СН_I та СН_{IIa}.

Приклад 6

Хворий З. 50 років, діагноз: Гіпертонічна хвороба IIc., гіпертензивне серце, СН_o.

По вищеописаному процесу було проведено дослідження.

Отримані наступні результати: А - 0,449; В - 0,917.

Розрахунок:

[0,449:0,917]-100мкмоль/л=49,0мкмоль/л.

Вміст цитруліну в сироватці крові є 49,0мкмоль/л, що є показником норми.

Приклад 7

Хворий М. 54 роки, діагноз: Гіпертонічна хвороба IIc., гіпертензивне серце, СН_I.

По вищеописаному процесу було проведено дослідження.

Отримані наступні результати: А - 0,632; В - 0,917.

Розрахунок:

[0,632:0,917]-100мкмоль/л=69,0мкмоль/л.

Вміст цитруліну в сироватці крові є 69,0мкмоль/л, що є показником перевищення норми.

Приклад 8

Хворий Ч. 53 роки, діагноз: Гіпертонічна хвороба IIc., гіпертензивне серце, СН_{IIb}.

По вищеописаному процесу було проведено дослідження.

Отримані наступні результати: А - 0,824; В - 0,917.

Розрахунок:

[0,824:0,917]-100мкмоль/л=90,0мкмоль/л.

Вміст цитруліну в сироватці крові є 90,0мкмоль/л, що є показником перевищення норми і вищим за такий у хворого з СН_I.

Приклад 9

Хворий Ф. 42 роки, діагноз: ДКМП - ділятаційна кардіоміопатія СН_{IIa}.

По вищеописаному процесу було проведено дослідження.

Отримані наступні результати: А - 0,713; В - 0,890.

Розрахунок:

[0,713:0,890]-100мкмоль/л=80,1мкмоль/л.

Вміст цитруліну в сироватці крові є 80,1мкмоль/л, що є показником значного перевищення норми і значно вищим за такий у хворих з СН_I.

Приклад 10

Хворий Ш., 48 років, діагноз: Ревматизм у стадії ремісії, комбінована мітральна та аортальна вада серця, кардіосклероз, СН_o.

По вищеописаному процесу проведено дослідження.

Отримані наступні результати: А - 0,382; В - 0,790.

Розрахунок:

[0,382:0,790]-100мкмоль/л=48,4мкмоль/л.

Вміст цитруліну в сироватці крові є 48,4мкмоль/л, що є показником норми.

Приклад 11

Хворий Ф. 49 років, діагноз: Ревматизм в стадії ремісії, комбінована мітральна вада серця, кардіосклероз, СН_{IIb}.

По вищеописаному процесу було проведено дослідження.

Отримані наступні результати: А - 0,786; В - 0,790.

Розрахунок:

[0,786:0,790]-100мкмоль/л=90,9мкмоль/л.

Вміст цитруліну в сироватці крові є 90,9мкмоль/л, що є показником значного перевищення норми і значно вищим за такий у хворих з СН_I та у хворих на ІХС з СН_{IIa}.

Приклад 12

Хворий Д. 56 років, діагноз: ДКМП - ділятаційна кардіоміопатія СН_{III}.

По вищеописаному процесу було проведено дослідження.

Отримані наступні результати: А - 0,926; В - 0,914.

Розрахунок:

[0,926:0,914]-100мкмоль/л=101,3мкмоль/л.

Вміст цитруліну в сироватці крові є 101,3мкмоль/л, що є показником значного перевищення норми і значно вищим за такий у хворих з СН_I та у хворих на ІХС з СН_{IIa-b}.