



УКРАЇНА

(19) UA (11) 56187 (13) U
(51) МПК (2011.01)
G01N 33/48
G01N 33/49

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ ОСОБЛИВОСТЕЙ ПОШКОДЖЕННЯ ЕНДОТЕЛІЮ ТА ПРОЯВІВ ПАТОЛОГІЧНИХ ЗМІН У СУДИНАХ ПРИ ГОСТРОМУ КОРОНАРНОМУ СИНДРОМІ

1

2

(21) u201005851

(22) 14.05.2010

(24) 10.01.2011

(46) 10.01.2011, Бюл.№ 1, 2011 р.

(72) ТОПЧІЙ ІВАН ІВАНОВИЧ, КОПИЦЯ МИКОЛА ПАВЛОВИЧ, КІРІЄНКО ОЛЕКСАНДР МИКОЛАЙОВИЧ, АБОЛМАСОВ ОЛЕКСАНДР МИКОЛАЙОВИЧ, ЄФІМОВА НАТАЛІЯ ВОЛОДИМИРІВНА, ЩЕНЯВ-СЬКА ОЛЕНА МИКОЛАЇВНА

(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ТЕРАПІЇ ІМ. Л.Т.МАЛОЇ АМН УКРАЇНИ"

(57) Спосіб оцінки особливостей пошкодження ендотелію та проявів патологічних змін у судинах при гострому коронарному синдромі, який включає забір крові у пацієнтів, виділення та підрахування під мікроскопом як критерію структурного пошкодження ендотелію циркулюючих злуцених ендотеліальних клітин у збагаченій тромбоцитами пла-

змі, який **відрізняється** тим, що додатково як оціночний критерій визначають у сироватці крові концентрацію розчиненого кадгерину судинного ендотелію (VE-кадгерину), здійснюють сумісну оцінку критеріїв структурного пошкодження ендотелію, і якщо, у порівнянні з встановленою нормою, кількість циркулюючих злуцених ендотеліальних клітин у 10мкл збагаченої тромбоцитами плазми та концентрація VE- кадгерину у сироватці крові підвищені не менш, ніж у 2 рази, роблять висновок про пошкодження цілісності ендотелію та наявність патологічних змін у коронарних судинах, які виражаються у порушенні міжклітинної адгезії судинного ендотелію, що є взаємопов'язаними та підсилюючими факторами ризику розвитку серцево-судинних подій при гострих коронарних синдромах.

Корисна модель відноситься до галузі медицини, а саме до кардіології і може бути використана для оцінки структурної цілісності ендотеліального шару судинної стінки та проявів патологічних змін у судинах при різних формах гострого коронарного синдрому (ГКС).

Ендотелій судин є єдиним органом, який регулює гемодинаміку та перфузію відповідно до потреб кожного органу або тканини. Порушення цих регуляторних впливів призводить до змін в органах та системах, які слугують патогенетичною основою для багатьох патологічних процесів, зокрема для кардіоваскулярної патології. Зменшення пошкодження, корекція та підтримка адекватного функціонування ендотелію є одним з найбільш актуальним завданням сучасної терапії судинної патології. (Ю.І.Головченко, М.А.Трещинская. Обзор современных представлений об эндотелиальной дисфункции.// Consilium Medicum .- 2008 / Том 2 /№11.- стор.38-40.). Тому необхідним на даний час є: пошук нових маркерів прямого ендотеліального пошкодження та потенціальних біомаркерів серцево-судинних ризиків для удосконалення на

цій підставі способів оцінки особливостей структурного пошкодження судинного ендотелію при різних формах гострого коронарного синдрому (нестабільна стенокардія (НС), інфаркт міокарда (ІМ) без зубця Q).

Різноманітність сценаріїв ГКС, розвиток ускладнень залежить від багатьох причин, основними з яких є фактори, що сприяють дисфункції ендотелію, пошкодження його структурного стану.

Відомий спосіб оцінки ендотеліальної дисфункції при гострому коронарному синдромі, який базується на вимірюванні NO у якості маркера функції ендотелію (А.Н.Корж. Современные представления о структуре, функции и биологической роли сосудистого эндотелия // Международ- ный медицинский журнал.- №1.- 2003.-стр.130-133). Але недоліком є те, що нестабільність та короткий період життя молекули обмежує використання цього підходу. Визначення же стабільних метаболітів NO у плазмі або сечі (нітратів та нітри- тів) не може рутинно використовуватися у клітці у зв'язку з високими вимогами до підготовки хворих до обстеження. Іншим недоліком є врахування

(13) U

(11) 56187

(19) UA

лише порушення функції ендотелію, відсутня інформація про структурний стан самого ендотелію.

Відомий спосіб оцінки ендотеліального пошкодження при гострих коронарних синдромах (Christopher J. Boos, Simren K. Soor, Delene Kang and Gregory Y.H. Lip Relationship between circulating endothelial cells and the predicted risk of cardiovascular events in acute coronary syndromes // *European Heart Journal* 2007 28(9): 1092-11 01;), обраний нами за прототип.

Суть прототипу. При обстеженні пацієнтів, госпіталізованих з попереднім діагнозом: нестабільна стенокардія (НС), інфаркт міокарду (ІМ) без підвищення сегменту ST або ІМ з підвищенням сегменту ST, здійснюють забір цільної крові. Для оцінки структурної цілісності ендотелію з крові пацієнтів виділяють клітини ендотелію сумісно з тромбоцитами з подальшою стимуляцією агрегації тромбоцитів аденозиндифосфатом та виділяють утворені агрегати центрифугуванням. Кількісний аналіз циркулюючих злуцених ендотеліальних клітин здійснюють шляхом їх підрахування під флуоресцентним мікроскопом з визначенням середньої кількості ендотеліальних клітин у 10мкл збагаченій тромбоцитами плазмі (ЗТП). При цьому фізіологічно нормальним вважають виявлення 4-5 ендотеліоцитів у 10мкл ЗТП. При підвищенні, у порівнянні з нормою, кількості ендотеліальних клітин у 10мкл ЗТП свідчать про пошкодження структурної цілісності ендотелію та ризику розвитку серцево-судинних подій у широкому спектрі пацієнтів з гострим коронарним синдромом (ГКС).

Спосіб є інформативним, специфічним та швидким, але недолікам є те, що здійснення лише кількісного аналізу циркулюючих злуцених ендотеліальних клітин не дає повного уявлення особливостей структурного пошкодження ендотелію у пацієнтів з ГКС, що знижує об'єктивність та якість оцінки.

Задача корисної моделі - забезпечити можливість більш об'єктивної оцінки особливостей структурного пошкодження ендотелію шляхом вибору додаткового критерію для оцінки проявів патологічних змін у коронарних судинах при ГКС на клітинному рівні, що дозволить здійснювати більш ефективний відбір хворих для призначення своєчасної патогенетично обґрунтованої терапевтичної стратегії. А це, в свою чергу, дозволить гальмувати ризик розвитку серцево-судинних подій при ГКС.

Задача вирішується шляхом удосконалення відомого способу оцінки особливостей пошкодження ендотелію при ГКС, який включає забір крові у пацієнтів, виділення та підрахування під мікроскопом у якості критерію структурного пошкодження ендотелію циркулюючих злуцених ендотеліальних клітин у збагаченій тромбоцитами плазмі.

Ознаки, що відрізняють корисну модель від прототипу є такі:

- додатково у сироватці крові визначають концентрацію розчиненого кадгерину судинного ендотелію (VE-

- здійснюють сумісну оцінку критеріїв структурного пошкодження ендотелію;

- і якщо, у порівнянні з встановленою нормою, кількість циркулюючих злуцених ендотеліальних клітин у 10 мкл збагаченої тромбоцитами плазмі та концентрація VE- кадгерину у сироватці крові підвищені не менш, ніж у 2 рази, свідчать про пошкодження цілісності ендотелію та наявність патологічних змін у коронарних судинах, які виражаються у порушенні міжклітинної адгезії судинного ендотелію, що є взаємопов'язаними та підсилюючими факторами ризику розвитку серцево-судинних подій при гострих коронарних синдромах.

Необхідність вибору нових прямих маркерів та удосконалення способів оцінки особливостей пошкодження ендотелію та проявів патологічних змін у коронарних судинах при ГКС обумовлена наступним:

Відомо, що порушення цілісності ендотелію і, як наслідок, зміна його проникнення залежить від структурних перебудов в організації контактів ендотеліальних клітин. [Telo P, Lostaglio S, Dejana E. Structure of intercellular junctions in the endothelium. // *Therapie*. 1997; 52(5):395-8.2]. Також звісно, що зміни в проникненні ендотеліального шару пов'язані з ранніми стадіями атеросклерозу [Elena Gatitinal and Klaus Ley2 Immune and Inflammatory Mechanisms of Atherosclerosis // *Annu Rev Immunol*. 2009; 27: 165-197.]. Досліджено, що кадгерини є важливою складовою частиною адгезивних контактів, відповідальних за організацію цитоскелету клітин.[Lampugnani MG, Caveda L, Breviaro F, Dei Maschio A, Dejana E. Endothelial cell-to-cell junctions. Structural characteristics and functional role in the regulation of vascular permeability and leukocyte extravasation. // *Baillieres Clin Haematol*. 1993 Sep;6(3):539-58.]. VE-кадгерин опосередкує гомофільну агрегацію і злипання ендотеліальних клітин, що забезпечує неперервність ендотеліального моношару, і перешкоджає міграції кліток через пошкоджену область [Jaap D. van Buul, Floris P. van Alphen, and Peter L. Hordijk The presence of alpha-catenin in the VE-cadherin complex is required for efficient transendothelial migration of leukocytes // *Bi J Biol Sci*. 2009; 5(7): 695-705.].

У відомому рівні розвитку даної проблеми відсутні відомості щодо сумісної оцінки вищенаведених оціночних критеріїв особливостей структурного пошкодження ендотелію коронарних судин при ГКС.

В умовах спеціалізованого відділення гіпертензій та захворювань нирок та відділення реанімації та інтенсивної терапії ДУ „Інститут терапії ім. Л.Т.Малої АМН України" згідно запропонованої корисної моделі були обстежені 80 пацієнтів на ГКС (44 чоловіків та 36 жінок у віці від 42 до 68 років (середній вік (54+2,3 роки), госпіталізованих з діагнозом: нестабільна стенокардія (НС) - 24 хворих, інфаркт міокарду (ІМ) без зубця Q - 56 хворих.

Саме за власними даними оригінальних досліджень визначено, що пошкодження цілісності ендотеліального шару з підвищенням кількості злуцених циркулюючих ендотеліальних клітин супроводжується порушенням міжклітинної адгезії судинного ендотелію, що є взаємопов'язаними та підсилюючими факторами ризику розвитку серце-

во-судинних подій при гострих коронарних синдромах.

У запропонованій корисній моделі забезпечена можливість більш об'єктивно оцінювати особливості структурного пошкодження ендотелію, що дозволить ефективно відбирати хворих для призначення своєчасної патогенетично обґрунтованої терапевтичної стратегії. А це, в свою чергу, дозволить гальмувати ризик розвитку серцево-судинних подій при ГКС.

Математичну обробку даних здійснено на персональному комп'ютері з використанням статичної програми „Statistica”, 6,0. Вірогідність різниць оцінювали за критерієм t-Ст'юдента. Взаємозв'язок між показниками встановлювали за коефіцієнтом кореляції Пірсона.

Запропоновану корисну модель здійснюють таким чином: Встановлення у пацієнтів діагнозу здійснюють на підставі аналізу скарг, анамнезу, даних клініко-інструментальних обстежень та лабораторних методів досліджень.

При обстеженні пацієнтів, госпіталізованих з діагнозом: нестабільна стенокардія (НС), інфаркт міокарду (ІМ) без підвищення сегменту ST здійснюють забір цільної крові. Для оцінки структурної цілісності ендотелію використовують відомий метод, згідно якому з крові пацієнтів виділяють клітини ендотелію сумісно з тромбоцитами з подальшою стимуляцією агрегації тромбоцитів аденозиндифосфатом та виділяють утворені агрегати центрифугуванням. (Hiadovec, J. Circulating endothelial cells as a sign of vessels wall lesions // *Physiologia bohemoslovaca*. - 1978. - Vol.27.- P.400.). Кількісний аналіз циркулюючих злущених ендотеліальних клітин здійснюють шляхом їх підрахування під флуоресцентним мікроскопом з визначенням середньої кількості ендотеліальних клітин у 10мкл збагаченій тромбоцитами плазмі (ЗТП). При цьому фізіологічно нормальним вважають виявлення 4-5 ендотеліоцитів у 10мкл ЗТП.

Для більш об'єктивної оцінки особливостей структурного пошкодження ендотелію, згідно корисної моделі, додатково у якості оціночного критерію у сироватці крові визначають концентрацію розчинного VE-кадгерину за допомогою стандартної тест-системи для імуноферментного аналізу виробництва Bender MedSystems (Австрія). Процедура аналізу проводять відповідно вимогам інструкції, що надається до набору. Встановлена лабораторна норма (0,3+0,12)пг/мл. Здійснюють сумісну оцінку критеріїв структурного пошкодження ендотелію.

І якщо, у порівнянні з встановленою нормою, кількість циркулюючих злущених ендотеліальних клітин у 10мкл збагаченої тромбоцитами плазмі та концентрація VE- кадгерину у сироватці крові підвищені не менш, ніж у 2 рази, свідчать про пошкодження цілісності ендотелію та наявність патологічних змін у коронарних судинах, які виражаються у порушенні міжклітинної адгезії судинного ендотелію, що є взаємопов'язаними та підсилюючими факторами ризику розвитку серцево-судинних подій при гострих коронарних синдромах. Ступень відтворюваності корисної моделі – 95%.

Можливість використання корисної моделі у медичній практиці підтверджується клінічними прикладами.

Приклад 1

Хворий Т., чоловік, 42 роки, історія хвороби №2167, госпіталізований з діагнозом ІХС: нестабільна стенокардія (НС), що виникла вперше (стенокардія de novo). СН І ст. зі збереженою систолічною функцією лівого шлуночка. Скарги: на загальну слабкість, серцевий та головний біль. На момент надходження больовий синдром - відсутній. Анамнез: Вважає себе хворим з 12.05.2009р., з моменту, коли на тлі загального благополуччя (спав) виник пекучий біль за грудиною, з іррадіацією у ліву руку. Біль мінjala свою інтенсивність при зміні положення тіла і продовжувалась більш, ніж 1 час. Об'єктивно: Загальний стан хворого середньої важкості. Шкіра бліда. Перкуторно над легеньми - ясний звук, аускультативно - везикулярне дихання. Серцеві тони звучні, акцент ІІ тону над аортою. Артеріальний тиск (АТ) - 160/100мм. рт. ст.; ЧСС - 82 ударів у 1хв.

Для оцінки структурної цілісності судинного ендотелію у хворого здійснюють забір крові, виділяють та підраховують під мікроскопом кількість циркулюючих злущених ендотеліальних клітин у 10мкл збагаченій тромбоцитами плазмі.

Згідно з корисною моделлю, додатково у сироватці крові визначають концентрацію розчиненого кадгерину судинного ендотелію (VE- кадгерину). Здійснюють сумісну оцінку критеріїв особливостей структурного пошкодження ендотелію. Результати: визначено ІS циркулюючих злущених ендотеліальних клітин у 10мкл збагаченій тромбоцитами плазмі, що перевищує норму у 3 рази (норма 4-5 клітин). Концентрація VE- кадгерину у сироватці крові дорівнює 1,2пг/мл, яка перевищує норму у 4 рази (норма 0,3+0,12пг/мл) Одержані дані свідчать, що пошкодження цілісності ендотеліального шару та інтенсивність процесу злущення ендотеліальних клітин у хворого супроводжується порушенням міжклітинної адгезії судинного ендотелію. За пошкодженням ендотеліального шару неминуче виникає локальна агрегація тромбоцитів, що може загрожувати тромбоутворенням та призводити до пошкодження коронарного русла. Визначений стан диктує у якості патогенетично обґрунтованої терапії призначення цьому хворому: антикоагулянтної, антиагрегантної, а також дозованої коронаролітичної терапії (гепарин, нітрати, аспірин, тіклід). Для зниження високого ризику розвитку серцево-судинних подій необхідно призначати лікарські засоби, що покращують функцію ендотелію судин.

Приклад 2

Хворий Т., чоловік 56 років, (історія хвороби №1274) був госпіталізований з діагнозом: ІХС, дифузний кардіосклероз. Гіпертонічна хвороба ІІ ст. СН І ст. Скарги: скаржився на головний біль, періодичний біль в області серця важкість у голові. Протягом 25 років хворий страждав на гіпертонічну хворобу. Періодично лікувався.

Під час госпіталізації стан хворого середньої важкості. Шкіра звичайного кольору. Перкуторно над легеньми - ясний звук, аускультативно-

везикулярне дихання. Серцеві тони звучні, акцент II тону над аортою. Артеріальний тиск 190/110 мм.рт.ст. ЧСС 78 ударів у 1хв. Пульс 78 у 1хв. Печінка не збільшена. Під час госпіталізації хворому проводять загальноприйняті клініко - інструментально та біохімічні дослідження.

Для оцінки структурної цілісності судинного ендотелію здійснюють забір крові, виділяють та підраховують під мікроскопом кількість циркулюючих злущених ендотеліальних клітин у 10мкл збагаченій тромбоцитами плазмі. Визначено - 6 клітин, що перевищує норму на 20% (норма 4-5 клітин). У пацієнта відзначають незначне пошкодження структурної цілісності ендотеліального шару судинної стінки.

Згідно з корисною моделлю, додатково у сироватці крові визначають концентрацію розчиненого кадгерину судинного ендотелію (VE- кадгерину), яка дорівнює 0,5пг/мл і перевищує норму (0,3 пг/мл) на 60 %. У пацієнта відзначають незначні порушення міжклітинної адгезії судинного ендотелію та незначні патологічні зміни у коронарних судинах, що не потребує корекції стандартної дезагрегантної терапії, а саме залишають аспірин. Для покращення перебігу захворювання можливе призначення лікарських засобів, що покращують функцію ендотелію судин.

Загальні висновки: Якщо ІХС оцінювати як переміну періодів стабільного перебігу та загострення, то саме під час стабілізації відбувається поступове нарощування атеросклеротичної бляшки, що звужує просвіт судин, тоді як періоди загострення

характеризуються виникненням „уразливих“ бляшок або тільки порушенням цілісності ендотелію і тромбозом на місці розриву (або дефекту). Таку загальну морфологічну основу в коронарних судинах спостерігають і при нестабільній стенокардії (НС), і при інфаркті міокарду (ІМ) без зубця Q (еквівалент дрібно вогнищного ІМ). Часто між ними неможливо провести чіткого розділення і тому вони поєднані в одну групу гострих коронарних синдромів (ГКС).

У наведених клінічних спостереженнях наглядно показано, що у хворого на НС (клінічний приклад 1) більш виражені показники, за якими оцінюють особливості пошкодження ендотелію та активності патологічних змін у коронарних судинах (кількісна оцінка інтенсивності викиду злущених ендотеліальних клітин у кровоплин та концентрації VE- кадгерину), що пов'язано з більш тяжким загостренням хвороби. Таким чином, обрані оціночні критерії можуть слугувати важливими діагностичним і прогностичним тестом при розвитку серцево-судинних захворюваннях або можуть використовуватися для контролю ефективності лікування цієї категорії хворих. Технічний результат. Використання корисної моделі у медичній практиці, у порівнянні з прототипом, дозволить об'єктивувати оцінку особливостей структурного пошкодження ендотелію та більш ефективно відбирати хворих для призначення своєчасної патогенетично обґрунтованої терапевтичної стратегії, що, в свою чергу, забезпечить гальмування ризику розвитку серцево-судинних подій при ГКС.