



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 60897

(13) A

(51) 7 G01N33/48

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

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ АТЕРОСКЛЕРОЗУ

1

2

(21) 2003032707

(22) 28 03 2003

(24) 15 10 2003

(46) 15 10 2003, Бюл. № 10, 2003 р.

(72) Лизогуб Віктор Григорович, Бондарчук Олександр Миколайович, Брюзгіна Тетяна Семенівна

(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ

(57) Спосіб діагностики атеросклерозу, який включає визначення вмісту арахідонової кислоти в

крові методом газорідинної хроматографії, який відрізняється тим, що вміст арахідонової кислоти визначають в еритроцитах крові, додатково визначають вміст лінолевої кислоти в еритроцитах, розраховують співвідношення арахідонової і лінолевої кислот і при значенні цього співвідношення більше 0,1 діагностують атеросклероз, а при значенні від 0,4 до 0,8 - атеросклероз за наявності хронічного панкреатиту

Винахід, що заявляється, відноситься до медицини, точніше до кардіології та такого її розділу, як ліпідологія, і призначений для діагностики атеросклерозу, в тому числі і у випадках, ускладнених хронічним панкреатитом (ХП).

На теперішній момент атеросклероз вважається основною причиною розвитку фатальних інфарктів, ішемічних інсультів та гангрени нижніх кінцівок [1]. Як правило, атеросклероз клінічно значущим стає в момент виникнення ускладнень з боку серця, мозку та інших органів, до цього моменту тривалий час існуючи у вигляді метаболічних порушень, основною ознакою яких вважається підвищення рівня холестерину в сироватці крові. Тому в основі біохімічної діагностики атеросклерозу лежить визначення вмісту цього спирту в ліпопротеїдах високої та низької щільності сироватки крові.

Однак слід зазначити, що гіперхолестеринемія, гіпертригліцеридемія [2], гіперліпідемія [3] формуються також при хронічному панкреатиті. Тому при наявності ХП метаболічні порушення, викликані ушкодженням підшлункової залози, суттєво перешкоджають діагностиці атеросклерозу. Це, в свою чергу, призводить до утруднення ранньої діагностики атеросклерозу, а значить, і лікування буде розпочате з запізненням, що погіршить наслідки атеросклеротичних ушкоджень. З іншого боку, лікування атеросклерозу може запроваджуватись тоді, коли метаболічні зміни обумовлені ХП, а не атеросклеротичним процесом, тобто лікуватись буде атеросклероз, який ще не виник. В даному випадку тільки лікування саме хронічного панкреа-

титу може забезпечити нормалізацію метаболічних змін в крові. Таким чином, диференційна діагностика між атеросклерозом та атеросклерозом, що супроводжується хронічним панкреатитом, може дати змогу своєчасно і правильно призначити необхідні лікувальні заходи, що покращить наслідки розвитку атеросклеротичних змін.

Так, відомий спосіб діагностики атеросклерозу, який передбачає визначення індексу атерогенності, що розраховується на основі вмісту загального холестерину і холестерину ліпопротеїдів високої щільності [4]. Вказаний показник має високу достовірну цінність при виявленні схильності до формування атеросклерозу, тобто вказує на такий стан ліпідного обміну, за умов якого існує високий ризик розвитку атеросклерозу. Проте за наявності хронічного панкреатиту вказаний спосіб діагностики не дає можливості відрізнити зміни ліпідного спектру, які обумовлені патологією підшлункової залози, від змін ліпідного спектру, які є проявом атеросклерозу.

Найближчим аналогом (прототипом) способу, що заявляється, є спосіб діагностики атеросклерозу за допомогою визначення вмісту арахідонової кислоти в ліпопротеїдах високої та низької щільності в крові методом газорідинної хроматографії. Потім розраховують співвідношення арахідонової кислоти ліпопротеїдів високої щільності до арахідонової кислоти ліпопротеїдів низької щільності і при співвідношенні 0,9 встановлюють діагноз атеросклерозу [5].

Даний спосіб використовує в якості діагностичного критерію співвідношення вмісту арахідонової

(13) A

(11) 60897

(19) UA

кислоти в ліпопротеїдах високої та низької щільності, чим досягається діагностика атеросклерозу на самому ранньому етапі його розвитку, коли рівень загального холестерину знаходиться ще в межах норми

Недоліками способу-прототипу є наступні моменти: оскільки ліпопротеїди є транспортними формами екзогенних ліпідів, то спектр жирних кислот може залежати від характеру харчування пацієнта, також на спектр жирних кислот і, особливо, на рівень арахідонової кислоти може впливати наявність супутньої патології, що не дає змоги проводити диференційну діагностику атеросклерозу та атеросклерозу, що розвивається на тлі супутньої патології, зокрема хронічного панкреатиту

Задача що вирішується, полягає у використанні діагностичного критерію, який є характерним і для атеросклерозу, і для хронічного панкреатиту, а саме таких метаболічних змін в жирнокислотному складі еритроцитів, які відображають як розвиток атеросклеротичного процесу, так і запального процесу в підшлунковій залозі і, в той же час, дозволяють диференціювати їх

Технічним результатом нового способу буде забезпечення диференційною діагностики між атеросклерозом та атеросклерозом при наявності хронічного панкреатиту, що дозволить поліпшити якість лікування атеросклерозу

Поставлена задача вирішується там, що у відомому способі діагностики атеросклерозу, який включає визначення вмісту арахідонової кислоти в крові, наприклад, методом газорідної хроматографії, згідно винаходу, що вміст арахідонової кислоти визначають в еритроцитах крові, додатково визначають вміст лінолевої кислоти в еритроцитах, розраховують співвідношення арахідонової кислоти до лінолевої і при значенні цього співвідношення $>0,1$ діагностують атеросклероз, а при значенні від 0,4 до 0,8 - атеросклероз за наявності хронічного панкреатиту

Відмінною особливістю запропонованого способу діагностики є те, що визначають вміст арахідонової та лінолевої кислот в еритроцитах і розраховують їх співвідношення. При значенні цього співвідношення від 0,4 до 0,8 діагностують атеросклероз за наявності хронічного панкреатиту, а при значенні - 1,0 встановлюють діагноз атеросклерозу. Це дозволяє провести чітку диференційну діагностику між атеросклерозом і атеросклерозом за наявності хронічного панкреатиту. Вибір еритроцитів в якості субстрату зумовлений тим, що, по-перше, жирні кислоти в цих клітинах зберігають однотипний склад досить тривалий строк і тому зміни в ньому складі мають сталий характер, на який мало впливають екзогенні чинники, по-друге, співвідношення арахідонової та лінолевої кислот, на відміну від співвідношення вмісту арахідонової кислоти у ліпопротеїдах, точно відображає процеси обміну жирних кислот сімейства ω -6, оскільки лінолева кислота є есенціальною жирною кислотою, яка є попередником арахідонової кислоти і має лише екзогенне походження. Вказані жирні кислоти відіграють суттєву роль в процесі розвитку атеросклерозу [6]

Такий спосіб діагностики атеросклерозу за доступними літературними даними невідомий

Запропонований спосіб діагностики атеросклерозу здійснюється наступним чином. Кров для аналізу спектру жирних кислот ліпідів еритроцитів беруть з кубітальної вени натще. Еритроцити вибрані для аналізу тому, що їх жирнокислотний склад стабільний і слабо піддається впливу зовнішніх факторів. Піпеткою відбирають плазму, додають в пробірку з еритроцитами 10мл фізіологічного розчину та центрифугують при 1,5тис об/хв протягом 20 хвилин. Потім відсмоктують верхній шар і залишають осад (еритроцити). Еритроцити помішають в пробірку з притертою пробкою ємністю 10мл, додають 5-7мл хлороформно-метанольної суміші (у співвідношенні 2:1) і гримають 30хв в хоподильнику. Для кращого розділення фаз додають 1мл дистильованої води. Далі відбирають хлороформну фазу піпеткою Пастера. Для повної реакції етап екстракції повторюють двічі. Об'єднані хлороформні екстракти концентрують упарюванням до сухості в потоці азоту при температурі 45°C на водяній бані.

Дан до сухого осаду ліпідів додають 5мл 1% H_2SO_4 в метанолі і переносять розчин в скляну ампулу ємністю 10мл. Після запаювання проводять гідроліз і метилювання в термостаті при 85°C протягом 20 хвилин.

Екстракцію метильованих жирних кислот проводять двічі 5-мл порціями гексан-ефірної суміші (у співвідношенні 1:1). Для розділення фаз додають 1мл дистильованої води. Відбирають верхню фазу піпеткою Пастера. Об'єднані екстракти випарюють до сухості в потоці азоту при 45°C на водяній бані. Сухий осад розчиняють в 40-50мл чистого гексану і вводять у випарювач хроматографа в кількості 5мкл.

Газохроматографічний аналіз спектру жирних кислот ліпідів здійснюється на газовому хроматографі серії Цвет-500 в ізотермічному режимі з попут'яно-іонізаційним детектором при наступних умовах для визначення спектру жирних кислот ліпідів використовують скляну колонку (розміром 3мх0,3см), яка заповнена фазою 5% ПЕГС на хроматоні N-AW-HMDS (зерніня 0,125-0,160мм), температура тушонки 190°C, температура випарювання 250°C, розходження азоту і водню 35мл/хв, повтряння - 200мм/год, швидкість діаграми стрічки 240мм/год, чутливість шкали 10 А, об'єм проби, що вводиться, 3-5мкл, тривалість аналізу - 20 хвилин.

Кількісну оцінку спектру жирних кислот ліпідів еритроцитів проводять методом нормування площ і визначають долі кислот у відсотках. Похибка визначення $\pm 10\%$.

З жирнокислотного спектру визначають кількісний вміст арахідонової та лінолевої кислот. Розраховують співвідношення вмісту арахідонової кислоти до вмісту лінолевої та при його значенні $>1,0$ діагностують атеросклероз, а при значенні від 0,4 до 0,8 - атеросклероз за наявності хронічного панкреатиту.

Вказані цифрові значення були встановлені наступним чином. Як маркер атеросклерозу були використані дані хворих на постінфарктний кардіосклероз. Маркером хронічного панкреатиту були дані хворих, які анамнестично мали чітко діагностовані ознаки запального процесу в підшлунковій залозі. Основну групу склали 15 хворих на постін-

фарктний кардіосклероз за наявності хронічного панкреатиту. Групи порівняння склали хворі на хронічний панкреатит (ХП) (n=15), ішемічну хворобу серця (ІХС) (n=15), а також група здорових осіб (n=15). Результати газохроматографічного аналізу

спектру жирних кислот еритроцитів представлені в таблиці

Вміст (в %) арахідонової кислоти (C20:4) та лінолевої кислоти (C18:2) в ліпідах червоних клітин крові та їх співвідношення

Таблиця

Жирна кислота	Здорові (n=15)	ХП(n=15)	ХП та ІХС(n=15)	ІХС(n=15)
C20:4	13,9±0,7	3,0±0,5	7,1±0,7	13,2±0,8
C18:2	14,5±1,1	13,4±1,7	14,6±1,14	11,4±1,14
C20:4/C18:2	1,0	0,28±0,05	0,52±0,08	1,24±0,17

Варіаційний ряд який включає показники, що аналізуються в межах $M \pm 1\sigma$ (M - середня арифметична, σ - середнє квадратичне відхилення) в групі хворих на ХП, охоплював діапазон значень від 0,12 до 0,4, в групі хворих на ХП та ІХС - від 0,29 до 0,75, а в групі хворих на ІХС від 0,87 до 1,61.

Перевірка ефективності тесту показала, що у 12 (80,0%) з 15 хворих на ХП відношення арахідонової до лінолевої кислоти становило $<0,41$, що свідчить про високий ступінь достовірності щодо відсутності атеросклерозу. В групі хворих з ХП та ІХС вказаний показник був точним у 66,7% випадків. Таким чином, нижня межа діапазону для діагностики атеросклерозу за наявності хронічного панкреатиту становить 0,41. Подальший аналіз виявив, що 14 (88,9%) з 15 хворих на ХП та ІХС мають значення співвідношення $<0,8$, що також свідчить про високий ступінь достовірності щодо встановлення діагнозу атеросклерозу за наявності ХП. Варіаційний ряд хворих на ІХС на 100% потрапляє у діапазон $\geq 0,8$. В той же час, у здорових осіб співвідношення вмісту арахідонової кислоти до лінолевої кислоти в еритроцитах становить 1,0. Таким чином, для встановлення діагнозу атеросклерозу за наявності хронічного панкреатиту значення співвідношення вмісту арахідонової кислоти до лінолевої повинно потрапити у діапазон від 0,4 до 0,8. Для встановлення діагнозу атеросклерозу значення співвідношення вказаних есенціальних жирних кислот має становити $>1,0$.

Конкретні приклади втілення винаходу

Приклад №1. Хворий М., історія хвороби №16171 від 31.10.2002, поступив у відділення кардіології зі скаргами на серцевий біль, який виник під час психоемоційного стресу, тривав 15хв і зник після того, як пацієнт заспокоївся. У відділенні хворому провели електрокардіографічне дослідження, пробу з фізичним навантаженням, добове моніторування серцевого ритму. Даних за ішемічну хворобу серця виявлено не було. Хворому визначили рівень арахідонової та лінолевої кислот в еритроцитах та розрахували їх співвідношення, яке становило 1,2. Пацієнту встановили діагноз атеросклероз і направили на контрастне дослідження коронарних артерій. В результаті коронарографії виявлено атеросклеротичне ураження артерій серця. Таким чином діагноз атеросклерозу був підтверджений і хворому призначено відповідне лікування.

Приклад №2. Хворий П., історія хвороби №11321 від 01.08.2002, поступив у відділення кардіології зі скаргами на періодичний стискаючий біль в грудинній ділянці, який виникає при ходьбі

на 200м. Для того, щоб зняти напад, хворому необхідно 2 таб. нітроглицерину.

Хворому виконано добове моніторування серцевого ритму, де виявлено ознаки ішемії не лише під час фізичного навантаження, а й в стані спокою. Рівень холестерину становив 7,5 ммоль/л. Призначення адекватної антиангінальної терапії дало неповноцінний ефект: напади зберігались в стані спокою, хоча їх кількість зменшилась. Хворому було виконано газохроматографічне дослідження вмісту арахідонової та лінолевої кислот в еритроцитах та визначене їх співвідношення, яке становило 0,7. Було встановлено діагноз атеросклероз за наявності хронічного панкреатиту. Хворому було додатково призначена медикаментозна терапія супутнього хронічного панкреатиту. Така комплексна терапія виявилась ефективною, що проявлялось зменшенням кількості нападів ішемії - основної клінічної ознаки атеросклерозу і дало змогу пацієнту використовувати в подальшому при нападі одну таблетку нітроглицерину. В стані спокою напади не виникали.

В період з березня 2002 до березня 2003 року у гастроентерологічному та кардіологічному відділеннях МКЛ №12 запропонованим способом було обстежено 50 пацієнтів (25 пацієнтів з попереднім діагнозом ІХС та 25 пацієнтів з попереднім діагнозом ІХС за наявності супутнього ХП). Використання способу дозволило у 23 випадках встановити діагноз атеросклероз у хворих з попереднім діагнозом ІХС (помилка 10%), а у 24 - атеросклероз за наявності хронічного панкреатиту у хворих з попереднім діагнозом ІХС за наявності супутнього ХП (помилка 5%). Вказані діагнози було підтверджено за допомогою велоергометри, добового моніторування серцевого ритму, УЗД органів черевної порожнини, копрограми, аналізу сечі. Спосіб (прототип) має помилку діагностики 10%. Таким чином запропонований спосіб, в порівнянні з прототипом, дозволяє точно діагностувати атеросклероз за наявності ХП та проводити корекцію лікувальної тактики у такої категорії хворих.

Застосування даного методу дозволяє точно розрізнити атеросклероз при наявності хронічного панкреатиту а також провести відповідну диференційовану медикаментозну корекцію виявлених змін.

Перелік літератури

1. Климов А.Н., Никуличева Н.Г. Обмен липидов и липопротеидов и его нарушения. - С. - П. Питер, 1999. - с. 400.
2. Мансурова И.Д., Борщева Л.И., Рудая Б.А. Триглицеридемия у больных хроническим панкре-

атитом / Здоровоохранение Таджикистана - 1985 - №1 -С 31-33

3 Геплер Л И , А П Казимирчик, А Г Аманьяк
Клиническое значение некоторых метаболических нарушений у больных хроническим панкреатитом / Терапевтический архив - 1984 - Т56 - №11 - С 70-72

4 Дислиппротеинемия и ишемическая болезнь сердца / Под ред Е И Чазова, А И Климо-

ва - М , 1980 с 6

5 Гиріна О М , Пилипчак О М , Брюзгіна Т С / Патент України №42624А/ Спосіб діагностики атеросклерозу// Промислова власність Офіційний бюлетень - 2001 - №9 - С 4 134

6 Menhta J , Lopez L , Wargovich T Eicosapentaenoic acid its relevance in atherosclerosis and coronary artery disease Am J Cardiol, 1987, 59(1) - P 155-159