

Изобретение относится к медицине и касается кардиологии и клинической биохимии.

В зависимости от тяжести заболевания различают следующие наиболее часто встречающиеся клинические формы ишемической болезни сердца (ИБС): стабильную стенокардию напряжения, нестабильную стенокардию, острый инфаркт миокарда (ИОМ).

Известен способ клинической диагностики ИБС, согласно которого проводится комплексное обследование, включающее клинические и инструментальные (электрокардиография), а также клинко-лабораторные исследования: активность аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы, креатинкиназы, лактатдегидрогеназы и пр. [Диагностика и лечение внутренних болезней: Руководство для врачей. Под общей ред. Ф.И. Комарова. Т. 1 - М.: Медицина, 1996. - С. 120-143]. Однако, известный способ не всегда позволяет своевременно провести дифференциальный диагноз между стабильной стенокардией напряжения, нестабильной стенокардией и ОИМ. Известный способ клинической диагностики ИБС небезопасен для больных, т.к. программой исследования предусмотрено использование велоэргометрии и других физических нагрузочных тестов, кроме того, он многоэтапен и не всегда хорошо переносится больными. Применять его для ежедневного контроля динамики патологического состояния, используя мониторинг показателей, получаемых этим способом, не представляется возможным.

За прототип принят способ диагностики ОИМ путем определения в реакции непрямой гемагглютинации устойчивости белков миоглобина исследуемой сыворотки крови к повреждающему действию диагностикума, содержащего антигенов к миоглобину, и по содержанию миоглобина судят о наличии ОИМ [Староверов И. Масенко В. Филиппов И. и др. // Кардиология. - 1982. - №5. - С. 96-102].

Однако способ-прототип не позволяет установить диагноз стабильной стенокардии напряжения и нестабильной стенокардии.

В основу изобретения поставлена задача усовершенствования способа диагностики ИБС, путем воздействия разными дозами адреналина на белки сыворотки крови и оценки их устойчивости к денатурации, о которой судят по появлению свободных небелковых SH-групп, тем самым обеспечивается повышение чувствительности и достоверности способа и возможность диагностики наиболее часто встречающихся клинических форм ИБС: стабильной стенокардии напряжения, нестабильной стенокардии, ОИМ, таким образом осуществляется ранняя диагностика этих клинических форм.

Поставленная задача решается тем, что в предлагаемом способе диагностики ИБС путем определения устойчивости белков сыворотки крови к денатурации, согласно изобретению, в сыворотке крови определяют исходную спонтанную денатурацию белков по содержанию свободных небелковых SH-групп, и в случае их наличия диагностируют ОИМ, а в случае их отсутствия, в сыворотку крови добавляют адреналин и затем повторно определяют наличие денатурации белков по содержанию свободных небелковых SH-групп, и в зависимости от концентрации адреналина, вызвавшей денатурацию белков и появление свободных небелковых SH-групп, судят о клинической форме ишемической болезни сердца: при стабильной стенокардии напряжения концентрация адреналина составляет более $2,7 \cdot 10^{-4}$ М, а при нестабильной стенокардии - от $2,7 \cdot 10^{-4}$ М и менее.

Сущность изобретения заключается в том, что в сыворотке крови больного ИБС определяют исходную спонтанную денатурацию белков по содержанию свободных небелковых SH-групп для исключения ОИМ, т.к. нами установлено, что при ОИМ в сыворотке крови спонтанно возникает денатурация белков, которая определяется по появлению свободных небелковых SH-групп. В случае их отсутствия, в сыворотку крови добавляют адреналин таким образом, чтобы его конечная концентрация составила $2,7 \cdot 10^{-4}$ М. Указанная конечная концентрация адреналина у здоровых лиц и у больных со стабильной стенокардией напряжения не вызывает денатурацию белков сыворотки крови, в связи с чем свободные небелковые SH-группы в сыворотке крови не появляются, т.е. они не определяются. У больных с нестабильной стенокардией напряжения адреналин в конечной концентрации $2,7 \cdot 10^{-4}$ М вызывает денатурацию белков сыворотки крови, в связи с чем появляются свободные небелковые SH-группы в сыворотке крови, т.е. они определяются.

При этом мы исходили из того, что ключевая роль уникальной нативной структуры белков в процессе свертывания крови и тромбообразования достаточно хорошо известна [Грицюк А.И., Амосова К.М., Грицюк И.А. Практическая гемостазиология. - Киев.: Здоров'я, 1994. - 256 с], а сами эти процессы рассматриваются как важнейшие звенья в развитии и прогрессировании ИБС [Диагностика и лечение внутренних болезней: Руководство для врачей. В 3-х томах. По общей редакцией Ф.И. Комарова. Т.1. - М.: Медицина, 1996. - С. 120-143]. В пусковом механизме свертывания крови отводится важная роль фактору Хагемана (фактор XII) [Грицюк А.И., Амосова К.М., Грицюк И.А. Практическая гемостазиология. - Киев.: Здоров'я, 1994. - 256 с], активация которого происходит в результате его взаимодействия с разными по своей природе стимулами, в том числе и с адреналином, поэтому в основу разработки предлагаемого способа и легли данные литературы о роли адреналина в пусковом механизме свертывания крови [Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия. - М.: Медицина. 1990. - С. 464].

Предлагаемый нами способ осуществляется следующим образом. У обследуемого, с соблюдением правил асептики, из кубитальной вены производят забор крови в количестве 7,0 мл в сухую стерильную пробирку. Кровь доставляют в лабораторное отделение и общепринятым способом получают сыворотку крови.

В сыворотке крови определяют исходную спонтанную денатурацию белков по содержанию свободных небелковых SH-групп методом амперометрического титрования (АМТ) (Заявка на изобретение №96124935, приоритет от 27.12.96 г.) и по их наличию или отсутствию первоначально судят об ОИМ, причем их появление в сыворотке крови свидетельствует о наличии у больного ОИМ.

В том случае, если в сыворотке крови отсутствуют спонтанно денатурированные белки, то денатурацию белков сыворотки крови осуществляют *in vitro*, путем ее соединения с адреналином, конечная концентрация которого в исследуемом образце первоначально составляла $2,7 \cdot 10^{-4}$ М. Затем производят термостатирование такой биологической смеси в течение 10 минут, при температуре 37°C, после чего вновь определяют наличие денатурированных белков по содержанию свободных небелковых SH-групп. В

зависимости от концентрации адреналина, вызвавшей денатурацию белков и вследствие этого появление свободных небелковых SH-групп, судят о клинической форме ишемической болезни сердца, причем при стабильной стенокардии напряжения концентрация адреналина, вызвавшая денатурацию белков сыворотки крови и вследствие этого появление свободных небелковых SH-групп, составляла более $2,7 \cdot 10^{-4}$ М, а при нестабильной стенокардии - от $2,7 \cdot 10^{-4}$ М и менее. Получены следующие результаты.

Установлено, что у здоровых лиц, больных стабильной стенокардией напряжения и нестабильной стенокардией, в сыворотке крови спонтанная денатурация белков не определяется, о чем судили по отсутствию в ней свободных небелковых SH-групп.

Вместе с тем, установлена четкая связь между клинической формой ИБС и устойчивостью белков сыворотки крови к денатурации под действием разных концентраций адреналина. Так, появление в сыворотке крови денатурированных белков под действием адреналина в конечной концентрации равной $2,7 \cdot 10^{-4}$ М и менее, свидетельствует о том, что у больного имеет место нестабильная стенокардия. Появление денатурированных белков в сыворотке крови, после воздействия на нее адреналином в конечной концентрации более $2,7 \cdot 10^{-4}$ М, свидетельствует о том, что у больного имеет место стабильная стенокардия напряжения.

Нами обследовано 65 больных ИБС в возрасте от 32 до 72 лет, из которых у 20 была стабильная стенокардия напряжения II-IV функционального класса, у 8 - нестабильная стенокардия и у 37 - ОИМ. В контрольную группу вошли 40 практически здоровых лиц в возрасте от 36 до 57 лет.

Повреждение белков сыворотки крови осуществлялось *in vitro*, путем добавления в нее адреналина, конечная концентрация которого в исследуемых образцах составляла $5,4 \cdot 10^{-4}$ М, $2,7 \cdot 10^{-4}$ М и $1,35 \cdot 10^{-4}$ М.

О денатурации белков сыворотки крови адреналином судили по появлению свободных небелковых SH-групп, определение которых проводили методом АМТ, и их количество выражали в мкМ/л.

Предварительно определяли исходную спонтанную денатурацию белков сыворотки крови по содержанию в ней свободных небелковых SH-групп. В случае их отсутствия, в сыворотку крови добавляли адреналин, таким образом, чтобы его конечная концентрация в каждом исследуемом образце составляла $5,4 \cdot 10^{-4}$ М, $2,7 \cdot 10^{-4}$ М и $1,35 \cdot 10^{-4}$ М.

Нами получены следующие результаты (табл. 1). У всех обследуемых здоровых лиц контрольной группы адреналин в конечных концентрациях $5,4 \cdot 10^{-4}$ М, $2,7 \cdot 10^{-4}$ М и $1,35 \cdot 10^{-4}$ М не вызывал денатурацию белков сыворотки крови, о чем свидетельствовало отсутствие свободных небелковых SH-групп, т.е. их количество было равно 0 мкМ/л.

У всех больных со стабильной стенокардией напряжения адреналин в конечных концентрациях равных $2,7 \cdot 10^{-4}$ М и $1,35 \cdot 10^{-4}$ М не вызывал денатурацию белков сыворотки крови, о чем свидетельствовало отсутствие свободных небелковых SH-групп, т.е. их количество было равно 0 мкМ/л. У 6-ти больных со стабильной стенокардией напряжения адреналин в конечной концентрации $5,4 \cdot 10^{-4}$ М вызывал денатурацию белков сыворотки крови, о чем свидетельствовало появление свободных небелковых SH-групп, т.е. их количество было равно 27-7 мкМ/л.

У всех больных с нестабильной стенокардией адреналин в конечных концентрациях $5,4 \cdot 10^{-4}$ М, $2,7 \cdot 10^{-4}$ М и $1,35 \cdot 10^{-4}$ М вызывал денатурацию белков сыворотки крови, о чем свидетельствовало появление свободных небелковых SH-групп, содержание которых составляло от 31 до 12 мкМ/л.

Такие результаты свидетельствуют о том, что заявляемый нами способ, в отличие от существующих способов и способа-прототипа, позволяет диагностировать клинические формы ИБС, путем определения устойчивости белков сыворотки крови к денатурации под действием разных концентраций адреналина, о чем судили по появлению или отсутствию свободных небелковых SH-групп.

Проведено изучение чувствительности и диагностической ценности способа-прототипа и предлагаемого нами способа, сравнительные результаты которых представлены в табл.2.

Как видно из табл. 2, заявляемый нами способ превосходит по чувствительности и диагностической ценности способ-прототип. Примеры конкретного выполнения.

Пример 1. У донора П-ва, с соблюдением правил асептики, из кубитальной вены производили забор венозной крови в количестве 7,0 мл в сухую стерильную пробирку. Кровь доставляли в лабораторное отделение и общепринятым способом получали сыворотку крови.

В исследуемой сыворотке крови не выявлена спонтанная денатурация белков, т.к. Содержание в ней свободных небелковых SH-групп составило 0 мкМ/л.

Затем в сыворотку крови донора добавили адреналин, конечная концентрация которого составила $5,4 \cdot 10^{-4}$ М. После этого в исследуемой сыворотке крови вновь не выявили денатурацию белков, т.к. содержание в ней свободных небелковых SH-групп составило 0 мкМ/л.

Такие данные свидетельствуют о высокой устойчивости белков сыворотки крови донора к воздействию адреналина в конечной концентрации $5,4 \cdot 10^{-4}$ М, что характерно для здоровых лиц.

Пример 2. Больной О-в, 1927 года рождения, доставлен в кардиореанимационное отделение 411 ОГБ 29.08.96г., в 10 часов 25 минут с диагнозом: Ишемическая болезнь сердца, стабильная стенокардия напряжения, III функциональный класс.

С соблюдением правил асептики, из кубитальной вены производили забор венозной крови в количестве 7,0 мл в сухую стерильную пробирку. Кровь доставляли в лабораторное отделение и общепринятым способом получали сыворотку крови.

В исследуемой сыворотке крови не выявлена спонтанная денатурация белков, т.к. - содержание в ней свободных небелковых SH-групп составило 0 мкМ/л.

Затем во вторую порцию сыворотки крови больного добавили адреналин, конечная концентрация которого составила $2,7 \cdot 10^{-4}$ М, и в этой исследуемой порции сыворотки крови также не выявили денатурацию белков, т.к. содержание в ней свободных небелковых SH-групп составило 0 мкМ/л.

После этого в третью порцию сыворотки крови больного добавили адреналин, конечная концентрация

которого составила $5,4 \cdot 10^{-4}$ М, и в этой исследуемой порции сыворотки крови обнаружили денатурацию белков, т.к. содержание в ней свободных небелковых SH-групп составило 16 мкМ/л.

Такие данные свидетельствуют о том, что белки сыворотки крови обследованного больного были устойчивы к воздействию адреналина в конечной концентрации $2,7 \cdot 10^{-4}$ М, которая не вызывала их денатурацию и не были устойчивы к воздействию адреналина в конечной концентрации $5,4 \cdot 10^{-4}$ М, которая вызывала их денатурацию, что характерно для больных стабильной стенокардией напряжения.

Пример 3. Больной М-в, 1948 года рождения, доставлен в кардиореанимационное отделение 411 ОГ 06.05.97 г., в 20 часов 15 минут с диагнозом: Ишемическая болезнь сердца, нестабильная стенокардия.

С соблюдением правил асептики, из кубитальной вены производили забор венозной крови в количестве 7,0 мл в сухую стерильную пробирку. Кровь доставляли в лабораторное отделение и общепринятым способом получали сыворотку крови.

В исследуемой сыворотке крови не выявлена спонтанная денатурация белков, т.к. содержание в ней свободных небелковых SH-групп составило 0 мкМ/л.

После этого во вторую порцию сыворотки крови больного добавили адреналин, конечная концентрация которого составила $1,35 \cdot 10^{-4}$ М, и в этой исследуемой порции сыворотки крови обнаружили денатурацию белков, т.к. содержание в ней свободных небелковых SH-групп составило 12 мкМ/л.

Такие данные свидетельствуют о том, что белки сыворотки крови обследованного больного не были устойчивы к воздействию адреналина в конечной концентрации $1,34 \cdot 10^{-4}$ М, которая вызывала их денатурацию, что характерно для больных нестабильной стенокардией.

Пример 4. Больной Г-в, 1948 года рождения, доставлен в кардиореанимационное отделение 411 ОГ 06.05.97 г., в 20 часов 15 минуте диагнозом: Острая, двусторонняя крупноочаговая пневмония, тяжелое течение.

С соблюдением правил асептики, из кубитальной вены производили забор венозной крови в количестве 7,0 мл в сухую стерильную пробирку. Кровь доставляли в лабораторное отделение и общепринятым способом получали сыворотку крови. В исследуемой сыворотке крови не выявлена спонтанная денатурация белков, т.к. содержание в ней свободных небелковых SH-групп составило 0 мкМ/л.

Затем в сыворотку крови больного добавили адреналин, конечная концентрация которого составила $5,4 \cdot 10^{-4}$ М. После этого в исследуемой сыворотке крови вновь не выявили денатурацию белков, т.к. содержание в ней свободных небелковых SH групп составило 0 мкМ/л.

Такие данные свидетельствуют о высокой устойчивости белков сыворотки крови обследуемого больного к воздействию адреналина в конечной концентрации $5,4 \cdot 10^{-4}$ М, что не характерно для больных ИБС.

Полученные данные свидетельствуют о том, что заявляемый нами способ, в отличие от способа-прототипа обладает большей чувствительностью и позволяет диагностировать наиболее часто встречающиеся клинические формы ИБС: стабильную стенокардию напряжения, нестабильную стенокардию и ОИМ.

Кроме того, заявляемый способ не опасен для больных, т.к. выполняется *in vitro*, прост в исполнении, значительно сокращает время на проведение исследования, не требует дорогостоящих тест-систем и специального оборудования и позволяет своевременно получать достоверные и точные результаты при диагностике ИБС.

О преимуществе предлагаемого способа свидетельствует и тот факт, что аналогов, позволяющих на молекулярном уровне *in vitro* диагностировать указанные клинические формы ИБС, не существует.

Т а б л и ц а 1

Показатели денатурации белков сыворотки крови при воздействии адреналина
у здоровых и больных ИБС

Конечная кон- центрация адре- налина в исследуемой сы- воротке крови	Число обследо- ванных (n)	Содержание свободных небелко- вых SH-групп, мкМ/л (M _{max} -M _{min})		Число лиц, у ко- торых появились свободные не- белковые SH- группы
		Исходное	После добавле- ния адреналина	
Здоровые лица				
5,4 · 10 ⁻⁴ М	40	0	0	0
2,7 · 10 ⁻⁴ М	40	0	0	0
1,35 · 10 ⁻⁴ М	40	0	0	0
Острый инфаркт миокарда				
5,4 · 10 ⁻⁴ М	37	52-12	78-35	37
2,7 · 10 ⁻⁴ М	37	52-12	71-29	37
1,35 · 10 ⁻⁴ М	37	52-12	60-21	37
Стабильная стенокардия напряжения				
5,4 · 10 ⁻⁴ М	20	0	27-7	6
2,7 · 10 ⁻⁴ М	20	0	0	0
1,35 · 10 ⁻⁴ М	20	0	0	0
Нестабильная стенокардия				
5,4 · 10 ⁻⁴ М	8	0	31-15	8
2,7 · 10 ⁻⁴ М	8	0	21-12	8
1,35 · 10 ⁻⁴ М	8	0	12-0	7

Таблица 2

Сравнительная характеристика чувствительности и диагностической ценности предлагаемого способа и способа-прототипа при диагностике клинических форм ИБС

Группы обследуемых	Способ прототип	Заявляемый способ		
		Обнаружены свободные небелковые SH-группы, абс. %		
		Конечная концентрация адреналина в сыворотке крови		
		$5,4 \cdot 10^{-4}$ М	$2,7 \cdot 10^{-4}$ М	$1,35 \cdot 10^{-4}$ М
Доноры, n=40	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Острый инфаркт миокарда, n=37	30 (81,1%)	20 (100%)	20 (100%)	20 (100%)
Стабильная стенокардия напряжения, n=20	0 (0%)	6 (30%)	0 (0%)	0 (0%)
Нестабильная стенокардия, n=8	0 (0%)	8 (100%)	8 (100%)	7 (87,5)