



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **72817** (13) **U**  
(51) МПК  
**G01N 33/48** (2006.01)

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: <b>u 2012 02643</b>	(72) Винахідник(и): <b>Мхітарян Лаура Сократівна (UA), Євстратова Ірина Никифорівна (UA), Василинчук Наталія Миколаївна (UA), Дроботько Тетяна Федорівна (UA), Міщенко Лариса Анатоліївна (UA)</b>
(22) Дата подання заявки: <b>05.03.2012</b>	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>27.08.2012</b>	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>27.08.2012, Бюл.№ 16</b>	(73) Власник(и): <b>НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР "ІНСТИТУТ КАРДІОЛОГІЇ ІМЕНІ АКАДЕМІКА М.Д. СТРАЖЕСКА" НАМН УКРАЇНИ, вул. Народного ополчення, 5, м. Київ, 03151, Україна (UA)</b>

## (54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ РИЗИКУ УРАЖЕННЯ ОРГАНІВ-МІШЕНЕЙ У ХВОРИХ НА ГІПЕРТОНІЧНУ ХВОРОБУ

### (57) Реферат:

Спосіб визначення ризику ураження органів-мішеней (серця, судин, нирок) у хворих на гіпертонічну хворобу (ГХ) включає забір крові, отримання сироватки. Здійснюють визначення вмісту кінцевих продуктів вільнорадикального окислення білків сироватки крові - 1,4-динітрофенілгідрозонів, для цього для аналізу беруть 0,1 мл сироватки крові хворого, здійснюють осад білків сироватки крові за допомогою (0,9 мл) 20 % розчину трихлороцтової кислоти (ТХОК), додають до денатурованих білків рівний об'єм (1мл) 0,1М 2,4-ДФГ (2,4-динітрофенілгідрозин), що розчинений в 2N HCl і етиловому спирті та видержаний в киплячій бані до повного розчинення 2,4-ДФГ, в контрольну пробу додають замість 2,4-ДФГ рівний об'єм 2N HCl, здійснюють інкубацію при кімнатній температурі протягом однієї години, потім проби центрифугують при 6000 g протягом 15-20 хвилин, осад промивають 3 рази розчином етанол - етилацетат (1:1), центрифугують при 6000 g протягом 15-20 хвилин для екстракції ліпідів та 2,4-ДФГ, який не прореагував з карбонільними групами окислених білків, отриманий осад підсушують з метою усунення розчинника, що залишився (етанол - етилацетат) і потім розчиняють в 8М розчині сечовини, сечовину приливають до осаду в об'ємі 4 мл і витримують в киплячій бані протягом 5 хвилин до повного розчинення, оптичну щільність 1,4-динітрофенілгідрозонів, що утворилися реєструють на спектрофотометрі при довжині хвилі 370 нм, результати розраховують як оптичну щільність на мілілітр сироватки крові  $D_{370}/\text{мл}$ , та при значеннях, вищих за 5,5 Од/мл роблять висновок про можливість ураження органів-мішеней.

UA 72817 U



Корисна модель належить до медицини та біології та може бути використана для прогнозування ризику ураження органів-мішеней (серця, судин, нирок) у хворих на гіпертонічну хворобу (ГХ).

Відомий спосіб визначення дисфункції у хворих гіпертонічною хворобою, ускладненою ішемічним інсультом [RU 2331880, МПК G01N 33/48, дата публікації: 20.08.2008], за яким центрифугують периферичну венозну кров хворого на градієнті щільності фіколл-верографін  $\rho=1,077$  та за допомогою фазово-контрастної мікроскопії здійснюють розрахунок в 10 полях зору кількості ендотеліоцитів на 100 лімфоцитів, та по їх кількості оцінюють дисфункцію ендотелію судин.

Недоліком такого способу є те, що він має обмежену сферу застосування тому, що відображує лише ураження мозкових судин.

Відомими та широко розповсюдженими способами визначення ураження органів-мішеней є визначення мікроальбумінерії (МА), кліренсу креатиніну, що визначають ураження нирок, С-реактивного протеїну (СРП) для визначення запального компоненту при ураженні судин, показники ліпідного обміну - вміст холестерину (ХС) в сироватці крові та вміст холестерину ліпопротеїдів низької щільності (ЛПНЩ), що характеризують атеросклеротичне ураження судин та ін. Способи передбачають використання готових тест-наборів фірми BioSystems (Іспанія) з використанням біохімічного аналізатора.

Наявність ураження органів-мішеней оцінюють, виходячи з того, що у практично здорових осіб ці показники мають наступні значення:

- мікроальбумінерія - 0 г/л;
- кліренс креатиніну - 80-106 мкмоль/л;
- С-реактивний протеїн - 0-5 мг/л;
- Вміст холестерину - 4,1-5,2 ммоль/л;
- Вміст холестерину ліпопротеїдів низької щільності - 2,1-2,5 ммоль/л.

Ці способи мають наступні недоліки: використовується декілька методів дослідження, що демонструє ураження нирок та судин окремо, також визначення цих показників відображує вже ураження, які сталися, що не дає можливості прогнозувати ці ушкодження і підвищувати ефективність лікування хворих на гіпертонічну хворобу. Окрім того тест-набори реагентів мають велику вартість, що обмежує сферу їх застосування.

Найбільш близьким по технічній суті процесу, що пропонується, є процес визначення показника гіпертрофії лівого шлуночка (ЛШ), який досліджують методом ЕХОКГ в режимах М - і секторального сканування на приладах "Sonoline SL-1" (Siemens, Німеччина) та "Sonoline-Omnia" (Siemens, Німеччина) за загальноприйнятою методикою. Масу міокарда ЛШ (ММЛШ) розраховують за формулою Penn-Convention:

$$\text{ММЛШ} = 1,04 \times [(\text{КДР} + \text{Тзд} + \text{Тмд})^3 - \text{КДР}^3] - 13,6 \text{ г}$$

де КДР - кінцевий діастолічний розмір лівого шлуночка;

Тзд - товщина задньої стінки лівого шлуночка в діастолу;

Тмд - товщина міжшлуночкової перегородки в діастолу. Індекс ММЛШ (ІММЛШ) - як її відношення до площі поверхні тіла. Збільшеним вважають ІММЛШ, що перебільшує 125 і 100 г/м<sup>2</sup> у чоловіків і жінок, відповідно.

Стан церебрального кровоплину оцінюють за допомогою дуплексного сканування екстра - та інтракраніальних артерій, яке проводять на апараті "Sonoline omnia" (Siemens, Німеччина) по стандартній методиці. При дослідженні загальної (ЗСА), зовнішньої (ЗвСА) та внутрішньої (ВСА) сонних артерій визначають діаметр судини (Д) та товщину комплексу інтима-медіа (ТІМ). Потовщенням вважають ТІМ більшу за 0,9 мм. Визначають наявність атеросклеротичних бляшок. Стенозуючим ураженням вважають ступінь звуження судини більшу за 20 %.

Цей процес має наступні недоліки: процес потребує застосування дороговартісної апаратури та використання тривалого часу дослідження.

В основу розробки поставлено задачу створення способу визначення ризику ураження органів-мішеней у хворих на гіпертонічну хворобу, в якому за рахунок застосування визначення нового маркера ризику ураження органів-мішеней у хворих на гіпертонічну хворобу та нових дій, режимів та застосованих речовин забезпечується підвищення специфічності та точності оцінки та прогнозування ураження органів-мішеней, прогресування гіпертонічної хвороби і, тим самим, підвищення ефективності диференційної діагностики, що оптимізує та підвищує ефективність лікування хворих на гіпертонічну хворобу.

Для вирішення цієї задачі спосіб визначення ризику ураження органів-мішеней у хворих на гіпертонічну хворобу передбачає забір крові, та отримання сироватки.

Новим у способі є те, що визначають в сироватці крові хворих на ГХ продукти вільнорадикального окислення білків - 2,4-динітрофенілгідразонів (2,4-ДФГ), при цьому для

аналізу беруть 0,1 мл сироватки крові хворого, здійснюють осад білків сироватки крові за допомогою (0,9 мл) 20 % розчину трихлороцтової кислоти (ТХОК), додають до денатурованих білків рівний об'єм (1мл) 0,1 М 2,4-ДФГ (2,4-динітрофенілгідазин), що розчинений в 2N HCl і етиловому спирті та видержаний в киплячій бані до повного розчинення 2,4-ДФГ, в контрольну пробу додають замість 2,4-ДФГ рівний об'єм 2N HCl, здійснюють інкубацію при кімнатній температурі протягом однієї години, потім проби центрифугують при 6000 g протягом 15-20 хвилин, осад промивають 3 рази розчином етанол - етилацетат (1:1), центрифугують при 6000 g протягом 15-20 хвилин для екстракції ліпідів та 2,4-ДФГ, який не прореагував з карбонільними групами окислених білків, отриманий осад підсушують з метою усунення розчинника, що залишився (етанол-етилацетат) і потім розчиняють в 8М розчині сечовини, сечовину приливають до осаду в об'ємі 4 мл і витримують в киплячій бані протягом 5 хвилин до повного розчинення, оптичну щільність 1,4-динітрофенілгідазонів, що утворилися реєструють на спектрофотометрі при довжині хвилі 370 нм, результати розраховують як оптичну щільність на мілілітр сироватки крові  $D_{370}$ /мл, та при значеннях, вищих за 5,5 Од/мл роблять висновок про можливість ураження органів-мішеней (серця, судин, нирок).

Як показують проведені дослідження вміст 2,4-динітрофенілгідазонів в сироватці крові хворих на ГХ показує значне підвищення рівня останніх у порівнянні із практично здоровими донорами як при ушкодженні серцевого м'язу, звуженні судин, недостатньої функції нирок та порушенні ліпідного обміну, що є універсальним показником групи вищезгаданих ушкоджень.

Спосіб ілюструється наступними прикладами:

Для впровадження способу необхідна наступна апаратура: центрифуга, спектрофотометр. По вищеописаному способі було проведено дослідження, для аналізу брали 0,1 мл сироватки крові хворого, здійснювали осад білків сироватки крові за допомогою (0,9 мл) 20 % розчину трихлороцтової кислоти (ТХОК), додавали до денатурованих білків рівний об'єм (1 мл) 0,1М 2,4-ДФГ (2,4-динітрофенілгідазин), що розчинений в 2N HCl і етиловому спирті та видержаний в киплячій бані до повного розчинення 2,4-ДФГ, в контрольну пробу додавали замість 2,4-ДФГ рівний об'єм 2N HCl, здійснювали інкубацію при кімнатній температурі протягом однієї години, потім проби центрифугували при 6000 g протягом 15-20 хвилин, осад промивали 3 рази розчином етанол - етилацетат (1:1), центрифугували при 6000 g протягом 15-20 хвилин для екстракції ліпідів та 2,4-ДФГ, який не прореагував з карбонільними групами окислених білків, отриманий осад підсушували з метою усунення розчинника, що залишився (етанол - етилацетат) і потім розчиняли в 8М розчині сечовини, сечовину приливали до осаду в об'ємі 4 мл і витримували в киплячій бані протягом 5 хвилин до повного розчинення, оптичну щільність 1,4-динітрофенілгідазонів, що утворилися реєстрували на спектрофотометрі при довжині хвилі 370 нм, результати розраховували як оптичну щільність на мілілітр сироватки крові  $D_{370}$ /мл.

Приклад 1.

Хворий К., 56 років, діагноз: гіпертонічна хвороба I-II ст. без наявності коронарного атеросклерозу і без ураження органів-мішеней. Отримані наступні результати:  $D_{370}$ -0,52, кількість сироватки крові - 0,1 мл

Розрахунок:  $[0,52: 0,1]=5,2 D_{370}/мл$ .

Вміст фенілгідазонів - 5,2  $D_{370}/мл$  не перевищує нормальні значення, що є показником відсутності вільнорадикальної модифікації білкових молекул.

- мікроальбумінерія - 0 г/л;
- вміст креатиніну - 89 мкмоль/л;
- С-реактивний протеїн - 1 мг/л;
- Вміст холестерину - 4,9 ммоль/л;
- Вміст холестерину ліпопротеїдів низької щільності - 2,2 ммоль/л.
- ММЛШ- 105 г/м<sup>2</sup>;
- Звуження судин - 5 %.

Отримані дані свідчать про те, що органи-мішені не уражені.

Приклад 2.

Хворий М., 46 років, діагноз: гіпертонічна хвороба I-II ст. без наявності коронарного атеросклерозу і без ураження органів-мішеней.

По вищеописаному способу було проведено дослідження.

Отримані наступні результати:  $D_{370}$ -0,65, кількість сироватки крові - 0,1 мл

Розрахунок:  $[0,65:0,1]=6,5 D_{370}/мл$ .

Вміст фенілгідазонів - 6,5  $D_{370}/мл$  незначно перевищує нормальні значення, що є показником початкового вільн радикального окислення білків сироватки крові і може бути прогностичним показником подальшого ураження нирок, судин, мозку.

- мікроальбумінерія - 0 г/л;

- вміст креатиніну - 86 мкмоль/л;
  - С-реактивний протеїн - 1,2 мг/л;
  - Вміст холестерину - 5,0 ммоль/л;
  - Вміст холестерину ліпопротеїдів низької щільності - 2,0 ммоль/л.
- 5
- ММЛШ - 98 г/м<sup>2</sup>;
  - Звуження судин - 7 %.

Отримані дані свідчать про те, що органи-мішені ще не уражені, але має місце несприятливий прогноз, щодо ураження органів-мішеней.

Приклад 3.

10 Хворий С, 50 років, діагноз: гіпертонічна хвороба 1-М ст. без наявності коронарного атеросклерозу з ураженням нирок.

По вищеописаному способу було проведено дослідження. Отримані наступні результати:

Д<sub>370</sub>-0,74, кількість сироватки крові - 0,1 мл

Розрахунок: [0,74:0,1]=7,4 Д<sub>370</sub>/мл.

15 Вміст фенілгідразонів - 7,4 Д<sub>370</sub>/мл перевищує нормальні значення, що є показником модифікації білків сироватки крові.

- мікроальбумінерія - 18;
- вміст креатиніну - 65 мкмоль/л;
- С-реактивний протеїн - 5,3 мг/л;
- 20 - Вміст холестерину - 5,1 ммоль/л;
- Вміст холестерину ліпопротеїдів низької щільності - 2,3 ммоль/л.
- ММЛШ- 95 г/м<sup>2</sup>;
- Звуження судин - 6 %.

25 Отримані дані свідчать про ураження нирок на тлі значної інтенсифікації процесів вільнорадикального окислення білків, наявність запального компонента але без дисліпідемії.

Приклад 4.

Хворий З., 52 роки, діагноз: гіпертонічна хвороба I-II ст. з наявністю коронарного атеросклерозу та гіпертрофією міокарда (ММЛШ більше 125 г/м<sup>2</sup>).

По вищеописаному способу було проведено дослідження. Отримані наступні результати:

30 Д<sub>370</sub>-1,02, кількість сироватки крові - 0,1 мл

Розрахунок: [1,02:0,1]=10,2 Д<sub>370</sub>/мл.

Вміст фенілгідразонів - 10,2 Д<sub>370</sub>/мл перевищує нормальні значення, що є показником модифікації білків сироватки крові.

- мікроальбумінерія - 0,5 г/л;
- 35 - вміст креатиніну - 81 мкмоль/л;
- С-реактивний протеїн - 5,8 мг/л;
- Вміст холестерину - 6,2 ммоль/л;
- Вміст холестерину ліпопротеїдів низької щільності - 3,5 ммоль/л;
- ММЛШ- 145 г/м<sup>2</sup>;
- 40 - Звуження судин - 36 %.

Отримані дані свідчать про ураження серцевого м'язу, звуження мозкових судин на тлі значної інтенсифікації процесів вільнорадикального окислення ліпідів та білків і дисліпідемії.

Приклад 5.

45 Хворий Б., 58 років, діагноз: гіпертонічна хвороба I-II ст. з наявністю коронарного атеросклерозу, гіпертрофією міокарда (ММЛШ більше 125 г/м<sup>2</sup>), ураженням нирок.

По вищеописаному способу було проведено дослідження. Отримані наступні результати:

Д<sub>370</sub>-1-32, кількість сироватки крові - 0,1 мл

Розрахунок: [1,32: 0,1] = 13,2 Д<sub>370</sub>/мл.

50 Вміст фенілгідразонів - 13,2 Д<sub>370</sub>/мл значно перевищує нормальні значення, що є показником суттєвої модифікації білків сироватки крові.

- мікроальбумінерія - 25 г/л;
- вміст креатиніну - 51 мкмоль/л;
- С-реактивний протеїн - 6,7 мг/л;
- Вміст холестерину - 6,9 ммоль/л;
- 55 - Вміст холестерину ліпопротеїдів низької щільності - 4,5 ммоль/л;
- ММЛШ-142 г/м<sup>2</sup>;
- Звуження судин - 41 %.

Отримані дані свідчать про ураження серцевого м'язу, звуження мозкових судин та ураження нирок на тлі значної інтенсифікації процесів вільнорадикального окислення ліпідів та білків і дисліпідемії.

Таким чином одним із основних факторів ризику ушкодження органів-мішеней при гіпертонічній хворобі можуть бути не тільки модифіковані ліпіди, а в більший мірі вільнорадикально модифіковані білки.

5 Проведені дослідження вмісту 2,4-динітрофенілгідразонів в сироватці крові хворих на ГХ показали значне підвищення рівня останніх на порівняння із практично здоровими донорами як при ушкодженні серцевого м'язу, звуженні судин, недостатньої функції нирок та порушенні ліпідного обміну, що є показником вищезгаданих ушкоджень, так і в умовах неушкодженості органів-мішеней, що може бути прогностичним фактором ризику для диференційної діагностики і, тим самим оптимізації лікувального процесу.

10 Внаслідок цього підвищується економія робочого часу, хімічних реагентів, специфічність, точність діагностики і тим самим - ефективність лікування хворих на гіпертонічну хворобу, які мають ознаки окислювального стресу.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

15

Спосіб визначення ризику ураження органів-мішеней (серця, судин, нирок) у хворих на гіпертонічну хворобу (ГХ), що включає забір крові, отримання сироватки, який **відрізняється** тим, що здійснюють визначення вмісту кінцевих продуктів вільнорадикального окислення білків сироватки крові - 1,4-динітрофенілгідразонів, для цього для аналізу беруть 0,1 мл сироватки крові хворого, здійснюють осад білків сироватки крові за допомогою (0,9 мл) 20 % розчину трихлороцтової кислоти (ТХОК), додають до денатурованих білків рівний об'єм (1 мл) 0,1М 2,4-ДФГ (2,4-динітрофенілгідразин), що розчинений в 2N HCl і етиловому спирті та видержаний в киплячій бані до повного розчинення 2,4-ДФГ, в контрольну пробу додають замість 2,4-ДФГ рівний об'єм 2N HCl, здійснюють інкубацію при кімнатній температурі протягом однієї години, потім проби центрифугують при 6000 g протягом 15-20 хвилин, осад промивають 3 рази розчином етанол - етилацетат (1:1), центрифугують при 6000 g протягом 15-20 хвилин для екстракції ліпідів та 2,4-ДФГ, який не прореагував з карбонільними групами окислених білків, отриманий осад підсушують з метою усунення розчинника, що залишився (етанол - етилацетат) і потім розчиняють в 8М розчині сечовини, сечовину приливають до осаду в об'ємі 4 мл і витримують в киплячій бані протягом 5 хвилин до повного розчинення, оптичну щільність 1,4-динітрофенілгідразонів, що утворилися, реєструють на спектрофотометрі при довжині хвилі 370 нм., результати розраховують як оптичну щільність на мілілітр сироватки крові  $D_{370}$ /мл, та при значеннях, вищих за 5,5 Од/мл роблять висновок про можливість ураження органів-мішеней.

20

25

30

---

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601