



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Статус: не действует (последнее изменение статуса: 02.07.2021)
Пошлина: Возможность восстановления: нет.

(21)(22) Заявка: [2011131662/15](#), 27.07.2011(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
27.07.2011

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 27.07.2011

(45) Опубликовано: [20.12.2012](#) Бюл. № 35

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2398239 C1, 27.08.2010. RU 2400751 C1, 02.02.2009. US 5547873 A, 20.08.1996. ТВОРОГОВА М.Г. Липиды и липопротеины. Лабораторная диагностика нарушений липидтранспортной системы. Клин. и лаб. диагностика, 2008, №10, с.21-32.

Адрес для переписки:

634050, г.Томск, пр. Ленина, 30, ГОУ ВПО "Национальный исследовательский Томский политехнический университет", отдел правовой охраны результатов интеллектуальной деятельности

(72) Автор(ы):

Канская Наталья Викторовна (RU),
Твердохлебов Сергей Иванович (RU),
Позднякова Ирина Анатольевна (RU),
Федорова Нина Александровна (RU),
Пичугин Владимир Федорович (RU),
Канский Александр Викторович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Национальный исследовательский Томский политехнический университет" (RU),
Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Сибирский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (RU),
Учреждение Российской Академии Медицинских Наук Научно-исследовательский институт кардиологии Сибирского отделения РАМН (RU)

(54) СПОСОБ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ТЕЧЕНИЯ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно кардиологии, и может быть использовано для прогнозирования течения ишемической болезни сердца (ИБС). До и после лечения определяют модифицированные ЛП (а) путем обработки 0,6 мл сыворотки крови 0,2 мл 0,1% раствором Тритона X-100, инкубацией 15 мин при 20°C, перемешиванием смеси методом встряхивания 120 раз в 1 мин, дезинтеграцией с последующим добавлением 7% раствора полиэтиленгликоля 6000 и электрофоретическим разделением в геле агарозы в лунке 4×20 мм. При снижении уровня ЛП(а) на 30% и более, а уровня общего холестерина на 15% и более и увеличении ЛПВП крови более 30% и холестерина ЛПВП с 0,8 до 1,6 ммоль/л по сравнению с исходным уровнем прогноз течения заболевания считают благоприятным, способствующим переходу стенокардии напряжения ФК III-IV в ФК I-II. При снижении уровня модифицированных ЛП(а) менее 30%, общего холестерина менее 15% и увеличением ЛПВП крови менее 30% и холестерина ЛПВП менее 1,6 ммоль/л по сравнению с исходным уровнем прогноз заболевания считают неблагоприятным. Изобретение позволяет повысить точность способа прогнозирования течения ишемической болезни сердца. 1 табл., 6 ил., 2 пр.

Изобретение относится к медицине и может быть использовано в кардиологии или терапии.

Известны способы разделения на фракции липопротеинов крови методом аналитического ультрацентрифугирования (А.Н.Климов, Н.Г.Никульчева. Липиды, липопротеины и атеросклероз. - СПб.: Питер Пресс, с.98-102).

Известен способ разделения на фракции ЛП в полиакриламидном геле (Н.Н.Шацкая. Биохимические исследования в оценке состояния сердечно-сосудистой системы. В кн. "Методы исследований в профпатологии". - М., 1988, с.95-97).

Известны также способы разделения на фракции ЛП путем электрофореза в геле агарозы (Лаб. методы исследования / Под редакцией В.В.Меньшикова. М.: Медицина, 1987, с.248-249); SU 1720015 A, 15.03.1992; RU 2063040 C1, 27.06.1996; RU 2115121 C1, 10.07.1998; RU 2097038 C1, 27.11.1997; RU 2060034 C1, 20.05.1996; EP 0074610 A, 23.03.1983).

Недостатком данных способов является то, что они не позволяют выявить все фракции ЛП крови, включая хиломикроны (ХМ), липопротеины высокой плотности

(ЛПВП), липопротеины низкой плотности (ЛПНП), липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП) и ЛП(а), а служат для разделения на фракции ХМ, ЛПВП, ЛПНП, ЛПОНП от комплекса альбумина с неэтерифицированными жирными кислотами, а также не позволяют выявить минорные фракции модифицированных липопротеинов крови, а именно модифицированных Lipoprotein abnormal (Lp(a) или ЛП(а)).

Известен способ определения фракций липопротеинов крови авторов Канской Н.В., Федоровой Н.А., Перовой Н.В., Гарганеевой Н.П., Кожановой А.А., Байкова А.Н., Канского А.В., Похряева Е.Н. RU 2210079 С2, G01N 33/92, 10.08.2003, бюл. №22.

Данный способ является наиболее близким к предлагаемому по технической сущности и достигаемому результату и выбран в качестве прототипа, однако он не позволяет выявить минорные фракции модифицированных ЛП(а). Минорная фракция ЛП(а) является наиболее атерогенной. Поэтому для ранней диагностики заболевания особенно важно выявление ЛП(а) наряду с максимально полным определением фракций других ЛП крови. ЛП(а) являются предиктом атеросклероза и генетически обусловленным фактором, приводящим к инфаркту миокарда или ишемическому инсульту.

Целью предлагаемого изобретения является повышение точности способа. Указанная цель достигается тем, что кроме липидов крови определяют до и после лечения модифицированные ЛП(а) путем обработки 0,6 мл сыворотки крови 0,2 мл 0,1% раствором Тритона X-100, инкубацией 15 мин при 20°C, перемешиванием смеси методом встряхивания 120 раз в 1 мин, дезинтеграцией с последующим добавлением 7% раствора полиэтиленгликоля 6000 и электрофоретическим разделением в геле агарозы в лунке 4x20 мм и при снижении уровня ЛП(а) на 30% и более, а уровня общего холестерина на 15% и более и увеличении ЛПВП более 30%, холестерина ЛПВП с 0,8 до 1,6 ммоль/л и более по сравнению с исходным уровнем прогноз течения заболевания считают благоприятным, способствующим переходу стенокардии напряжения ФК III-IV в ФК I-II, а при снижении уровня модифицированных ЛП(а) менее 30%, общего холестерина менее 15% и увеличении ЛПВП крови менее 30%, холестерина ЛПВП крови менее 1,6 ммоль/л по сравнению с исходным уровнем прогноз заболевания считают неблагоприятным.

Новым в данном способе является то, что пробу сыворотки крови пациента обрабатывают детергентом тритон X-100, инкубируют 15 мин при 20°C, перемешивают смесь методом встряхивания 120 раз в 1 мин, дезинтегрируют, что позволяет дополнительно выявлять минорные фракции модифицированных липопротеинов крови и одновременно определяют общий холестерин, ЛПВП, холестерина ЛПВП крови до и после лечения ишемической болезни сердца.

Следовательно, только комплексная модернизация способа-прототипа позволяет получить желаемый результат.

Исследование ЛП разных классов при диагностике ишемической болезни сердца (ИБС) рекомендовано Всероссийским научным обществом кардиологов согласно положению рекомендаций Европейского общества по изучению атеросклероза - «Диагностика и коррекция нарушений липидного обмена с целью профилактики и лечения атеросклероза» (г.Москва, 2005 г.); Клиническая лабораторная диагностика, №10, 2008 г., с.21-32.

В настоящее время перспективными являются методы исследования липидов с детергентами (Тритон X-100 и др.). В лабораторной практике все больше используются прямые или гомогенные методы определения липопротеинов (ЛП) и их липидов. Такие методы основаны на использовании различных детергентов, способных блокировать или солубилизировать классы ЛП для специфического выделения ЛПВП, ЛПНП и других фракций ЛП.

При использовании таких методов изоляция других классов ЛП не требует дополнительных операций и концентрацию холестерина (ХС) в классах ЛП можно определить напрямую в сыворотке крови общепринятыми ферментными методами в той же кювете (Клиническая лабораторная диагностика, №10, 2008 г., с.21-32).

Увеличение концентрации ЛП abnormal или ЛП(а) в крови считают независимым фактором риска атеросклероза. При содержании в крови ЛП(а) более 300 мкг/мл при норме 0-300 мкг/мл риск возникновения коронарного атеросклероза увеличивается вдвое, а при одновременном повышении уровня ЛП(а) ХС и ХС ЛПНП - в 5 раз (J.A.M.A. - 2001. - Vol.285. - p.2486-2497, Eur. Heart. J. - 2003. - Vol.24, - p.1601-1610).

Для получения ПЭГ-6000 преципитата сыворотки крови использовался 7%-ный раствор ПЭГ-6000. Известно, что 7%-ный ПЭГ-6000 является предельной концентрацией для получения преципитатов сыворотки крови, содержащих иммунные комплексы и не содержащих грубодисперсных белков сыворотки крови. Применение 6%-ного раствора ПЭГ-6000 не позволяет полностью осадить иммунные комплексы сыворотки крови. Поэтому для повышения точности способа экспериментальным путем была выбрана 7%-ная концентрация ПЭГ-6000, позволяющая, с одной стороны, полностью осадить иммунные комплексы из сыворотки крови с гарантией

отсутствия грубодисперсных (высокомолекулярных) белков сыворотки крови, а с другой стороны, позволяющая полностью осадить циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК), присутствующие в сыворотке крови. Так, в случае концентрации ЦИК в сыворотке крови, равной 2,5 г/л, эта же концентрация ЦИК выявлена в 7%-ных преципитатах сыворотки крови (с результатом + 3%), что связано с увеличением числа манипуляций, а не изменением концентрации ЦИК в преципитатах сыворотки крови.

Инкубация 7% ПЭГ-6000 преципитата исследуемой сыворотки крови с красителем Судана Б повышает сродство красителя к ЛП преципитатов крови, а большой объем взятого для исследований образца крови позволяет выявить модифицированные ЛП(а), содержащиеся в крови больных ишемической болезнью сердца (ИБС) в очень низких концентрациях. Дополнительная обработка сыворотки крови Тритоном X-100 позволяет повысить точность способа и получить желаемый результат. Предлагаемый способ позволяет выявлять следующие минорные фракции модифицированных ЛП: ЛПВП, ЛПНП, ЛПОНП и ЛП(а).

Каждый вновь введенный в формулу изобретения признак выполняет функцию повышения точности и эффективности способа: обработка 0,6 мл пробы сыворотки крови пациента 0,2 мл 0,1% раствора Тритон X-100, инкубация пробы при 20°C в течение 15 мин, перемешивание смеси методом встряхивания 120 раз в 1 мин, и дополнительное выявление минорных фракций модифицированных липопротеинов одновременно с определением общего холестерина, ЛПВП, холестерина ЛПВП крови до и после лечения ишемической болезни сердца.

В настоящее время особое внимание уделяется исследованию минорных фракций модифицированных ЛП(а), в связи с чем разрабатываются способы лабораторной диагностики, позволяющие исследовать этот липопротеин крови. Он относится к апо-В-содержащим липопротеинам, богатым холестерином (ХС). ЛП(а) идентичен "тонущим" пре-β-ЛП (sinking pre-β-Lp), имеющим при электрофорезе подвижность пре-β-ЛП. ЛП(а) содержат 27% белка, 8% углеводов и 65% липидов, из которых ЭХС составляют 59%, НЭХС 14%, ФЛ 14%.

Белковым компонентом ЛП(а) является высокогликозилированный полипептид-апо(а), имеющий близкое структурное сродство к плазминогену - одному из факторов системы свертывания - противосвертывания крови. При росте концентрации как ЛП(а), так и его модифицированных форм в крови нарушаются процессы микроциркуляции в кровеносных артериях с возможным образованием микротромбов.

Благодаря наличию в структуре апо(а)сиаловых кислот ЛП(а) более отрицательно заряжен по сравнению с β-ЛП в электрическом поле, лучше растворим в воде, может взаимодействовать с ионами металлов (кальция). Этот липопротеин и его модифицированные формы гетерогенны. Все это свидетельствует об особой роли ЛП(а) и модифицированных ЛП(а) в атерогенезе.

ЛП(а) может взаимодействовать с ЛПНП-рецепторами, оказывая слабое влияние на активность ГМК-КоА редуктазы, на этерификацию ХС. Период полураспада ЛП(а) длиннее, чем у ЛПНП и составляет 3,3 суток. Содержание ЛП(а) в крови в норме не превышает 30 мг/л. При высокой концентрации в крови ЛП(а) выявляется в местах поражения сосудов в области скопления фибриногена. Повышенная концентрация ЛП(а) часто сочетается с П^а, П^б типами гиперлипидемий, при которых часто выявляются модифицированные ЛП. Поэтому в клинической практике крайне важно определение ЛП(а) одновременно с определением белков острой фазы воспаления. Установлено, что большинство гиполипидемических препаратов не влияет на повышенный уровень ЛП(а).

Фракция ЛП(а) гетерогенна. Установлено, что при электрофорезе ЛП(а) находятся в области β-глобулинов, но до 5% ЛП(а) при этом могут выявляться в области α-глобулинов. По причине такой выраженной гетерогенности достаточно сложно оценить при электрофорезе всю фракцию ЛП(а), а тем более ее минорные фракции, которые могут оставаться на линии старта, если размер их частиц достаточно велик. Поэтому использование общепринятого в исследованиях последнего пятидесятилетия детергента Тритон X-100 для обработки сыворотки крови, а именно липопротеинов крови, ведущее к частичной делипидизации ЛП и увеличению их подвижности при электрофорезе позволяет выявлять минорные фракции ЛП(а). В химической промышленности используются различные детергенты (при изготовлении стирального порошка, моющих средств и т.д.), но при работе с биологическим материалом используется преимущественно Тритон X-100. Режим обработки пробы Тритоном X-100 подбирался на основе экспериментальных исследований эмпирическим путем. Для этого использовали различные разведения Тритона X-100, различную температуру и различную экспозицию в минутах. При использовании различных концентраций раствора Тритон X-100 малые концентрации (ниже 0,1%) не увеличивали выделения минорных фракций ЛП, в том числе ЛП(а), а высокие концентрации (больше 0,1%) вели к полной делипидизации и разрушению структуры ЛП. Результат проведенного

исследования представлен в таблице №1.

Обработка 0,3 мл сыворотки крови для исследования липопротеинов разными концентрациями раствора Тритон X-100 в течение различного времени инкубации пробы при разной температуре.

| Детергент | Концентрация | Время инкубации | Температура, °С | Выявление фракции ЛП(а) |
|--------------|--------------|-----------------|-----------------|-------------------------|
| Тритон X-100 | 0,1 мл 0,01% | 10 минут | 15 | - |
| Тритон X-100 | 0,1 мл 0,01% | 15 минут | 20 | - |
| Тритон X-100 | 0,1 мл 0,01% | 20 минут | 25 | - |
| Тритон X-100 | 0,1 мл 0,1% | 10 минут | 15 | следы |
| Тритон X-100 | 0,1 мл 0,1% | 15 минут | 20 | + |
| Тритон X-100 | 0,1 мл 0,1% | 20 минут | 25 | следы |
| Тритон X-100 | 0,1 мл 0,15% | 10 минут | 15 | - |
| Тритон X-100 | 0,1 мл 0,15% | 15 минут | 20 | - |
| Тритон X-100 | 0,1 мл 0,15% | 20 минут | 25 | - |

Следовательно, оптимальными условиями обработки сыворотки крови раствором Тритон X-100 является концентрация 0,1% в объеме 0,1 мл, при температуре 20 градусов Цельсия в течении 15 минут

Поскольку ЛП(а) наиболее атерогенен, очень важно на ранних стадиях заболевания выявлять максимальное содержание ЛП(а) в крови каждого пациента. Это позволяет диагностировать ишемическую болезнь сердца еще до стадии значительных изменений других клинико-лабораторных показателей, повышает точность диагностики заболевания. В свою очередь таким пациентам рано назначается патогенетически обоснованная терапия. Не менее важно выявление минорных фракций ЛП(а) для оценки эффективности терапии заболевания и прогнозирования течения ишемической болезни сердца.

Все сказанное свидетельствует о крайней важности разработки способов лабораторной диагностики, позволяющих наиболее полно выявлять ЛП(а), его модифицированные формы и их минорные фракции.

В настоящее время в широкой клинической лабораторной практике недостаточно используют способы определения ЛП(а). В то же время популярность способа электрофоретического разделения на фракции ЛП крови в геле агарозы обусловлена его высокой чувствительностью, простотой осуществления и достаточной адекватностью получаемых результатов (Клиническая лабораторная диагностика, №10, 2008, С.21-32).

Существенные признаки, характеризующие изобретение, проявили в заявляемой совокупности новые свойства, явным образом не вытекающие из уровня техники в данной области и не являющиеся очевидными для специалиста.

Идентичной совокупности признаков не обнаружено при изучении патентной и научно-медицинской литературы.

Данное изобретение может быть использовано в медицинской практике для повышения точности диагностики степени атеросклероза при ишемической болезни сердца.

Таким образом, следует считать предлагаемое изобретение соответствующим условиям патентоспособности: «новизна», «изобретательский уровень», «промышленная применимость».

Метод основан на электрофоретической подвижности модифицированных липопротеинов и одновременном определении общего холестерина крови.

Изобретение будет понятно из следующего описания приложенных рисунков.

На фиг.1 представлены результаты электрофоретического разделения на фракции ЛП сыворотки крови: а - в группе контроля способом-прототипом; б - в группе контроля предлагаемым способом.

На фиг.2 (а, б) представлены результаты электрофоретического разделения на фракции ЛП сыворотки крови в группе больных ИБС до лечения.

На фиг.3 (а, б) представлены результаты электрофоретического разделения на фракции ЛП сыворотки крови больных после лечения.

На фиг.4 (а, б) представлены результаты электрофоретического разделения на фракции ЛП крови больных ишемической болезнью сердца с гиперхолестеролиемией.

На фиг.5 (а, б) представлены результаты электрофоретического разделения на фракции ЛП сыворотки крови больного ишемической болезнью сердца по способу-прототипу и предлагаемому способу.

На фиг.6 (а, б, в) представлены результаты электрофоретического разделения на фракции ЛП сыворотки крови больных по предлагаемому способу у больного ишемической болезнью сердца поле лечения, а также до и после лечения у другого пациента с ишемической болезнью сердца.

Способ осуществляется следующим образом поэтапно:

1) приготовление раствора Судана Б: 400 мг Судана Б растворяют в 20 мг

этиленгликоля на кипящей водяной бане в течение 50 минут, фильтруют, хранят в стеклянной посуде;

2) приготовление геля агарозы: 320 мг агарозы А фирмы "Sigma" растворяют в 20 мл воды при кипячении, затем помещают в термостат при 55°C; добавляют 20 мл раствора альбумина (1 г альбумина в 200 мл вероналмединалового буфера, pH 8,6). 3 мл геля агарозы наносят на обезжиренное горизонтально установленное предметное стекло, помещают металлический стальной стержень-брусочек 20×4 мм (высотой 10 мм), который после застывания геля убирают магнитом;

3) к 0,6 мл пробы сыворотки крови пациента добавляют 0,2 мл 0,1% раствора Тритон X-100, инкубируют 15 мин при 20°C, перемешивают смесь методом встряхивания 120 раз в 1 мин, затем добавляют 40 мл 7% полиэтиленгликоля (ПЭГ)-6000 и инкубируют 1 ч при 20°C, центрифугируют 40 мин при 25000 g. Осадок дважды промывают;

4) 0,25 мл раствора преципитата используют для электрофоретического исследования. К 0,25 мл преципитата сыворотки крови добавляют 0,15 мл раствора Судана Б, помещают на 1 ч в темный термостат при 40°C, затем добавляют 0,2 мл горячего раствора геля агарозы, смешивают, подогревают при 55°C и подогретым вносят в желобок геля агарозы;

5) предметное стекло помещают в камеру для электрофореза слоем агарозы вниз, электрофорез проводят в течение часа в холодильной камере при температуре 4°C при напряжении 100 В и силе тока 40-45 мА;

6) электрофореграмму фиксируют в 5% растворе уксусной кислоты в течение одного часа, затем высушивают между листами фильтровальной бумаги, непрерывно смачивая 96% этиловым спиртом;

7) денситометрию проводят на микрофотометре МФ-4;

8) проводят электрофорез липопротеинов крови;

9) определяют спектрофотометрическим методом холестерин ЛПВП: принцип метода: гепарин в присутствии ионов двухвалентного марганца вызывает осаждение пре β- и β-липопротеинов, а ЛПВП остаются в растворе.

Реактивы:

1. Хлористый марганец: марка 4, каталожный номер 120123.

2. Гепарин, фармакопейный, 5000 ед/мл.

3. Изопропиловый спирт, Ч, 150157.

4. Уксусная кислота ледяная, ХЧ, 190023.

5. Серная кислота, ХЧ, 170212.

6. Ортофосфорная кислота, Ч, 200200.

7. Хлорное железо, ХЧ, 070105.

8. Стандартный холестерин.

Приготовление реактивов.

Раствор хлорида марганца 2 М: 39,58 г $MnCl_2 \times 4H_2O$ растворить в 100 мл дистиллированной воды. Раствор стабилен в течение длительного времени.

Основной раствор хлорного железа: 25 г $FeCl_3 \times 6H_2O$ растворяют при нагревании на водяной бане с температурой 80°C в 80 мл концентрированной ортофосфорной кислоты, охлаждают и доводят объем ортофосфорной кислоты до 100 мл. Хранят в посуде из темного стекла длительное время. Рабочий раствор хлорного железа: 8 мл основного раствора осторожно смешивают с 80 мл концентрированной серной кислоты и охлажденную смесь доводят серной кислотой до объема 100 мл. Раствор стабилен в течение месяца. Стандарт холестерина: 50 мг кристаллического холестерина растворяют в 100 мл изопропилового спирта; стандарт стабилен в течение длительного времени при хранении в холодильнике.

Ход определения.

В пробирки помещают 1 мл сыворотки крови, добавляют 40 мл раствора гепарина и перемешивают, после этого приливают 50 мкл раствора хлорида марганца, тщательно перемешивают и помещают в лед на 30 мин.

Далее пробы центрифугируют в течение 10 мин при 2500 об/мин. 200 мкл супернатанта переносят в пробирки, добавляют по 2,0 мл изопропилового спирта, встряхивают и для экстракции холестерина оставляют стоять 10 мин при температуре 20-25°C, затем центрифугируют 10 мин при 2500 об/мин. В пробирки переносят 600 мкл супернатанта, добавляют 1,2 мл ледяной уксусной кислоты и 1,2 мл рабочего раствора хлорного железа. Пробы инкубируют в течение 15 мин в водяной бане при температуре 37°C. Оптическую плотность проб измеряют при λ 540-560 нм против воды. В каждой серии определений ставят стандарт холестерина: 200 мкл стандартного раствора холестерина обрабатывают так же, как и сыворотку. Контроль качества проводят с использованием контрольной сыворотки.

Расчет концентрации холестерина в альфа-липопротеидах (ЛПВП) проводят на основании стандарта.

Нормальный уровень холестерина в α -липопротеидах (ЛПВП) 0,88-2,09 ммоль/л.

Усовершенствование способа касается механического встряхивания пробы с

частотой 120 раз в 1 мин на лабораторном встряхивателе для приготовления реактивов фирмы «Immunotech a.s.», Чехия. Более частое или длительное встряхивание ведет к повышению температуры пробы и появлению рекомбинантных форм липопротеинов крови, что препятствует дальнейшему проведению исследования и искажает результат электрофоретического анализа пробы. Менее короткий период встряхивания, равный 30 сек, не позволяет улучшить результат исследования.

Далее сыворотку крови в течение 1 мин обрабатывают дезинтегратором "Microsonic ТМ" для полной дезинтеграции липопротеинов крови. Дезинтеграцию липопротеинов осуществляет Ultrasonic cell Disruptor производства Heat System YWC, 1938, New York 11735, Model Xh 2005, Serial NO, работающий с характеристикой электрического тока 50 вольт/ампер, мощностью 50 ватт, частотой тока 20 килогерц.

Количественную оценку фракций при денситометрии проводят следующим образом: определяют площадь каждого пика на хроматограмме по формуле $S=h \cdot B/2h$, где S - площадь пика, h - высота пика, $B/2h$ - ширина пика на половине его высоты.

Расчет проводится автоматически по соответствующей программе, и конечным результатом является процентное содержание каждой фракции липопротеидов, если она есть, по отношению ко всей сумме фракций, принятой за 100%.

Общий холестерин крови определяют стандартизированным методом в динамике. Предварительная обработка сыворотки крови раствором Тритон X-100 не влияет на выполнение анализа.

Метод основан на измерении оптической плотности холестерина и его эфиров с реактивом Либермана-Бурхарда. Большая часть холестерина находится в сыворотке крови в этерифицированном виде, продукт реакции холестерина с указанным реактивом поглощает свет в той же области спектра и имеет несколько больший коэффициент экстинкции, чем продукт реакции свободного холестерина. Для учета этого различия, а также частичного учета матричных эффектов (влияния белков и билирубина на результаты анализа) калибровка метода проводится по калибровочной сыворотке, содержание холестерина в которой определено референтным методом Абеля-Кендала.

Приготовление реактива Либермана-Бурхарда.

600 мл уксусного ангидрида и 300 мл уксусной кислоты наливают в двухлитровую колбу, помещают в ледяную баню и перемешивают на магнитной мешалке, затем приливают 100 мл охлажденной серной кислоты. Через 30 мин колбу удаляют из ледяной бани, ставят на мешалку и добавляют 20 г сульфата натрия, перемешивают до полного растворения соли 4-5 часов. Реактив стабилен 2 недели.

Ход анализа:

1. В сухие пробирки разливают по 5 мл реактива Либермана-Бурхарда, помещают в ледяную баню.

2. В первую пробирку наливают 0,2 мл дистиллированной воды (по стенке, медленно в течение 10 мин). Осторожно встряхивают и помещают в водяную баню.

3. С интервалом в 2 мин в остальные пробирку приливают по 0,2 мл исследуемой сыворотки, встряхивают, помещают в водяную баню.

4. Через 25 мин после добавления воды в первой пробирке измеряют оптическую плотность ее содержания против воды. Далее измеряют исследуемые пробы при длине волны (625 ± 10) нм.

5. Рассчитывают концентрацию холестерина в сыворотке крови по сравнению с калибровочной.

Для растворов продуктов реакции Либермана-Бурхарда закон Бугера-Ламберта-Бера соблюдается в пределах 0-400 мг/дл холестерина.

При проведении повторного исследования после лечения величина фракций ЛП(а) до лечения принимается за 100% и рассчитывается процентное значение величины снижения фракции модифицированных ЛП(а) после проведенной терапии ИБС.

В группе контроля в случае использования способа-прототипа ($n=10$) и предлагаемого способа ($n=12$) липопротеины не выявлены (фиг.1а, б). Оценен уровень общего холестерина крови, который составил у первых 10 пациентов $4,6 \pm 0,4$ ммоль/л и у второй группы пациентов $5,3 \pm 0,5$ ммоль/л. Нами обследованы 2 группы больных ИБС до и после лечения по 10 пациентов для способа-прототипа - I группа и 32 пациента - II группа для предлагаемого способа.

Диагноз пациентов: ИБС, стенокардия напряжения, ФК III-IV.

У пациентов I группы до лечения выявились мЛПНП, мЛПОНП (фиг.2а, б). Уровень холестерина сыворотки крови составил у них $7,8 \pm 0,8$ ммоль/л. После лечения при электрофорезе фракции мЛПНП и мЛПОНП стали менее интенсивными (фиг.3а, б).

Уровень общего холестерина сыворотки крови после лечения составил $6,3 \pm 0,5$ ммоль/л.

Диагноз после лечения: ИБС, стенокардия напряжения, ФК II-III. Заключение: прогноз течения ИБС благоприятный, но недостаточно точный.

После лечения ИБС у 6 пациентов выявлялась следовая трудно определяемая фракция модифицированных ЛП(а) (фиг.4а, б).

Уровень общего холестерина сыворотки крови после лечения составил во всей группе $6,4 \pm 0,5$ ммоль/л. Диагноз после лечения у пациентов этой группы (31 человек): ИБС, стенокардия напряжения, ФК II. Заключение: прогноз течения ИБС благоприятный. Пациенты этой группы представлены в клинических примерах. У одного пациента второй группы при снижении общего холестерина крови после лечения уровень ЛП(а) в сыворотке крови оставался достаточно высоким. Динамики после лечения выявлено не было. Прогноз течения ИБС у этого пациента расценивался как неблагоприятный.

Ложноположительных и ложноотрицательных случаев нами не выявлено, т.к. оценивались только объективные критерии эффективности проводимой терапии ИБС: результаты велоэргометрии, частота приступов стенокардии и соответственно доза принятого глицерина, а также результаты лабораторных методов исследования, выраженные количественно.

Пример 1. Больной К., 66 лет, история болезни №97, поступил в отделение ИБС и атеросклероза НИИ кардиологии г.Томска. Жалобы при поступлении на боли в области сердца колющего характера, иррадиирующие в левую подлопаточную область. Боли возникали при физической и эмоциональной нагрузке, снимались нитратами пролонгированного действия. Велоэргометрия была прекращена при нагрузке 50 Вт по причине усиления загрудинных болей. АД 180/100 мм рт.ст., пульс в покое 68 уд. в мин. Боли купируются нитроглицерином.

Результаты лабораторного исследования: ХС общий 7,9 ммоль/л, триацилглицериды 1,8 ммоль/л, ХС ЛПВП 0,8 ммоль/л, ЛПВП крови 16%.

Результаты электрофоретического исследования ЛП 7% ПЭГ-6000 преципитата сыворотки крови представлены на фиг.5а, а по предлагаемому способу - на фиг.5б. Выявлены фракции мЛПНП, мЛПОНП и мЛП(а).

Диагноз при поступлении: ишемическая болезнь сердца, стенокардия напряжения, ФК III-IV.

После проведенного лечения результаты лабораторного исследования: ХС общий 5,4 ммоль/л, триацилглицериды 1,4 ммоль/л, ХС ЛПВП 1,6 ммоль/л, ЛПВП крови 34%.

При электрофоретическом исследовании ЛП 7% ПЭГ-6000 преципитата сыворотки крови по предлагаемому способу фракции ЛП(а) не выявлены. Фиг.6а. содержит линию старта и ослабленную фракцию мЛПНП.

Заключение: отсутствие мЛП(а), значительное увеличение уровня ЛПВП крови до 34%, снижение холестерина крови на 65% и рост холестерина ЛПВП до 1,6 ммоль/л - свидетельствует о значительном улучшении состояния больного. Фракция ЛПНП ослаблена.

Диагноз при выписке: ишемическая болезнь сердца, стенокардия напряжения, ФКП. Заключение: прогноз течения ИБС благоприятный, о чем свидетельствует уменьшение функционального класса стенокардии напряжения с III-IV до II.

Пример 2. Больной Ф., 55 лет, история болезни №72, поступил в отделение ИБС и атеросклероза НИИ кардиологии г.Томска с жалобами на боли в области сердца, иррадиирующие под лопатку, возникающие при физической нагрузке. Велоэргометрия была прекращена при нагрузке 50 Вт по причине загрудинной боли и одышки. АД 170/110 мм рт.ст., пульс в покое 66 уд. в мин. Боли купируются нитроглицерином.

Результаты лабораторного исследования: ХС общий 7,7 ммоль/л, триацилглицериды 1,6 ммоль/л, ХС ЛПВП 0,9 ммоль/л, ЛПВП крови 13%.

Результаты электрофореза 7% ПЭГ-6000 преципитата сыворотки крови выявили наличие мЛПНП, мЛПОНП и мЛП(а) (фиг.6б). Результаты денситометрии мЛП: мЛПНП - 52%, мЛПОНП - 40%, мЛП(а) - 8%.

Диагноз при поступлении: ишемическая болезнь сердца, стенокардия напряжения, ФК III-IV.

После проведенного лечения результаты лабораторного исследования: ХС общий 5,2 ммоль/л, триацилглицериды 1,5 ммоль/л, ХС ЛПВП 1,8 ммоль/л, ЛПВП крови 31%.

Результаты электрофоретического исследования мЛП крови по предлагаемому способу после лечения представлены на фиг.6в.

Результаты денситометрии мЛП: мЛПНП - 57%, мЛПОНП - 41%, мЛП(а) - 2%.

Диагноз при выписке: ишемическая болезнь сердца, стенокардия напряжения, ФКИ. Снижение уровня ЛП(а) на 73%, а общего холестерина на 27% и увеличение ЛПВП крови до 31%, холестерина ЛПВП до 1,8 ммоль/л по сравнению с исходным свидетельствовало об эффективности лечения ИБС. Заключение: прогноз течения ИБС благоприятный, о чем свидетельствует уменьшение функционального класса стенокардии напряжения с III-IV до II.

Итак, при применении способа-прототипа прогноз течения ИБС основывался на уровне общего холестерина сыворотки крови и клинических данных, поэтому был

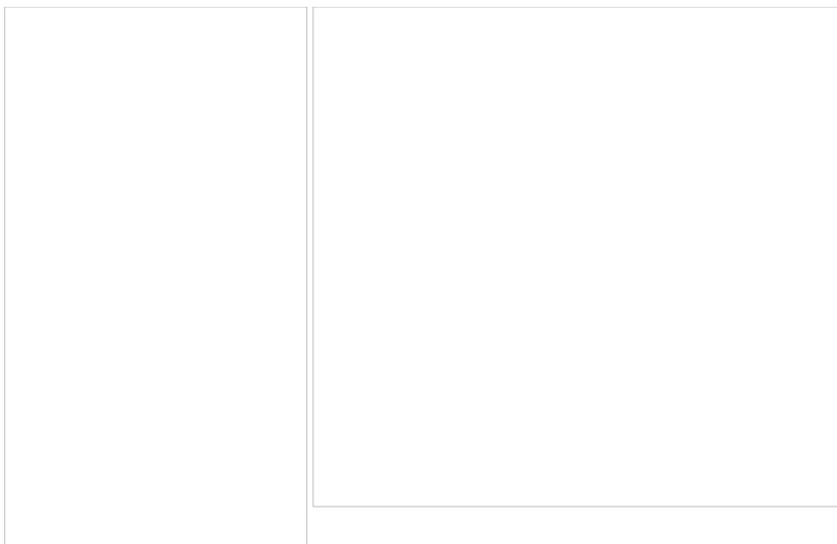
недостаточно точным. Способ применен у 42 пациентов с ИБС и 22 пациентов группы сравнения (контроль) с нейроциркуляторной дистонией. При снижении уровня мЛП(а) на 30% и более общего холестерина сыворотки крови на 15% и более и увеличении ЛПВП крови более 30% и холестерина ЛПВП с 0,8 до 1,6 ммоль/л и более прогноз течения ИБС был оценен как благоприятный, о чем свидетельствовало изменение функционального класса (ФК) стенокардии напряжения, а при изменении только одного из показателей был установлен неблагоприятный прогноз течения ИБС (переход стабильного течения в нестабильную форму стенокардии).

Ложноположительных случаев прогнозирования течения ИБС при использовании предлагаемого нами способа не наблюдалось. При этом предлагаемый способ прост в исполнении и интерпретации полученных результатов.

Формула изобретения

Способ прогнозирования течения ишемической болезни сердца путем исследования липидов сыворотки крови, отличающийся тем, что до и после лечения определяют модифицированные ЛП(а) путем обработки 0,6 мл сыворотки крови 0,2 мл 0,1% раствором Тритона X-100, инкубацией 15 мин при 20°C, перемешиванием смеси методом встряхивания 120 раз в 1 мин, дезинтеграцией с последующим добавлением 7%-ного раствора полиэтиленгликоля 6000 и электрофоретическим разделением в геле агарозы в лунке 4×20 мм и при снижении уровня ЛП(а) на 30% и более, а уровня общего холестерина на 15% и более и увеличением ЛПВП крови более 30% и холестерина ЛПВП с 0,8 до 1,6 ммоль/л по сравнению с исходным уровнем прогноз течения заболевания считают благоприятным, способствующим переходу стенокардии напряжения ФК III-IV в ФК I-II, а при снижении уровня модифицированных ЛП(а) менее 30%, общего холестерина менее 15% и увеличением ЛПВП крови менее 30% и холестерина ЛПВП менее 1,6 ммоль/л по сравнению с исходным уровнем прогноз заболевания считают неблагоприятным.

| | |
|--|--|
| | |
| | |



ИЗВЕЩЕНИЯ

ММ4А Досрочное прекращение действия патента из-за неуплаты в установленный срок пошлины за поддержание патента в силе

Дата прекращения действия патента: **28.07.2013**

Дата публикации: [20.06.2014](#)