



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: 2011131681/15, 27.07.2011(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
27.07.2011

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 27.07.2011

(45) Опубликовано: 27.09.2012 Бюл. № 27

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2089168 C1, 10.09.1997. RU 2122732 C1, 27.11.1998. RU 2210075 C2, 10.08.2003. Translated, with permission of the American College of Physicians, from Clinical guideline, Part 1. Guidelines for using serum cholesterol, night-density lipoprotein cholesterol, and triglyceride levels as screening tests for preventing coronary hearth disease in

adults. Ann Intern Med, 1996; 124:515-517. Найдено в БД Google.ru:
<http://www.mediasphera.ru/mjmp/97/1/r1-97-27.htm>.

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),
Научно-исследовательский институт кардиологии СО РАМН (RU)

(54) СПОСОБ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине и может быть использовано в кардиологии, терапии. Сущность способа: до и после лечения ишемической болезни сердца определяют модифицированные ЛП(а) путем обработки 0,6 мл сыворотки крови 0,2 мл 0,1% раствором Тритона X-100, инкубацией 15 минут при 20°C, перемешиванием смеси методом встряхивания 120 раз в мин, дезинтеграцией, с последующим добавлением 7% раствора полиэтиленгликоля 6000, инкубацией с красителем Суданом Б при 40°C в течение 1 ч с последующим электрофоретическим разделением ЛП в геле агарозы в лунке 4x20 мм. Оценивают лечение ишемической болезни сердца как эффективное при снижении уровня модифицированных ЛП(а) на 30% и более и увеличении в крови уровня ЛПВП до 30% и более, холестерина ЛПВП с 0,8 до 1,6 ммоль/л и более по сравнению с исходным уровнем. Использование предлагаемого способа позволяет повысить точность оценки эффективности лечения ишемической болезни сердца. 1 табл., 3 пр., 6 ил.

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. - Питер, пресс, с.98-102).

Известен способ разделения на фракции ЛП в полиакриламидном геле (Н.Н.Шацкая. Биохимические исследования в оценке состояния сердечнососудистой системы. В кн. "Методы исследований в профпатологии", Москва, 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.

Недостатком данного способа является то, что он не позволяет выявить минорные фракции модифицированных ЛП(а). Это связано с тем, что минорная фракция ЛП(а) является наиболее атерогенной. Поэтому для ранней диагностики заболевания особенно важно выявление минорной фракции ЛП(а) наряду с максимально полным определением фракций других ЛП крови. Целью предлагаемого изобретения является повышение точности способа. Указанная цель достигается тем, что исследуется сыворотка крови больного ишемической болезнью сердца до и после лечения. Модифицированные ЛП(а) определяют путем обработки 0,6 мл сыворотки крови 0,2 мл 0,1% раствором Тритона X-100, инкубацией 15 минут при 20°C, перемешиванием смеси методом встряхивания 120 раз в мин, с последующим добавлением 7% раствора полиэтиленгликоля 6000, инкубацией с красителем Суданом Б при 40°C в течение 1 ч с последующим электрофоретическим разделением ЛП в геле агарозы в лунке 4x20 мм и при снижении уровня модифицированных ЛП(а) на 30% и более по сравнению с исходным уровнем и увеличением в крови уровня ЛПВП до 30% и более, холестерина ЛПВП с 0,8 до 1,6 ммоль/л и более оценивают лечение ишемической болезни сердца как эффективное.

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 мин, дезинтегрируют, что позволяет дополнительно выявлять минорные фракции модифицированных липопротеинов крови до и после лечения ишемической болезни сердца, а также оценивают до и после лечения уровень ЛПВП и холестерина ЛПВП крови.

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

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 экспериментальным путем была выбрана 7%-ная концентрация ПЭГ-6000, позволяющая, с одной стороны, полностью осадить иммунные комплексы с гарантией отсутствия грубодисперсных (высокомолекулярных) белков, 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.

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 с последующим перемешиванием смеси методом встряхивания 120 раз в мин, дезинтеграцией одновременно с исследованием уровня ЛПВП, холестерина ЛПВП крови позволяет повысить точность способа и получить желаемый результат. Предлагаемый способ позволяет выявлять следующие минорные фракции модифицированных ЛП: ЛПВП, ЛПНП, ЛПОНП и ЛП(а) и исследовать ЛП сыворотки крови без предварительной ее обработки с последующим определением холестерина ЛПВП и ЛПНП. 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, дезинтеграция, определение ЛПВП и холестерина ЛПВП и дополнительное выявление минорных фракций модифицированных липопротеинов.

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 солюбилизовать 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).

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 родство 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 I^a, II^b 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 ТритонX-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.

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

пробы при разной температуре.

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 течение 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 и оценки эффективности лечения ишемической болезни сердца.

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

Метод основан на электрофоретической подвижности модифицированных и немодифицированных липопротеинов крови с последующим определением концентрации холестерина ЛПВП.

Изобретение будет понятно из следующего описания приложенных чертежей.

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.2а, б представлены результаты электрофоретического разделения на фракции ЛП сыворотки крови в группе больных ИБС способом-прототипом.

На фиг.3 представлены результаты электрофоретического разделения на фракции ЛП сыворотки крови больного Б: а - способом-прототипом; б - предлагаемым способом.

На фиг.4а и б представлены результаты электрофоретического разделения на фракции ЛП сыворотки крови больных после лечения.

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

На фиг.6а, б и в представлены результаты электрофоретического разделения на фракции ЛП сыворотки крови больных ишемической болезнью сердца по способу-прототипу и предлагаемому способу до и после лечения.

Способ осуществляется следующим образом поэтапно:

1) приготовление раствора Судана Б: 400 мг Судана Б растворяют в 20 мл 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 веронал-мединалового буфера, рН 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 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 нативной сыворотки крови для определения ЛПВП;

9) определяют спектрофотометрическим методом холестерин ЛПВП:

принцип метода: гепарин в присутствии ионов двухвалентного марганца вызывает осаждение пре-β- и β-липопротеинов, α-липопротеины 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 изо-пропилового 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 ЛПВП проводят на основании стандарта.

Нормальный уровень холестерина 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 TM» 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 кГц.

До лечения фракция ЛП (а) принимается за 100% и рассчитывается процентное значение величины снижения фракции минорных ЛП(а) после проведенной терапии ишемической болезни сердца, одновременно определяют процентное увеличение уровня ЛПВП и концентрацию холестерина ЛПВП после лечения.

Для подтверждения работоспособности предлагаемого способа и достижения технического результата в сравнении со способом-прототипом были обследованы группа контроля (n=10) и группа больных ИБС (n=22).

В группе контроля в 7% ПЭГ-6000 преципитатах сыворотки крови в случае использования способа-прототипа и предлагаемого способа ЛП не выявлены (фиг.1а, б).

В группе больных ИБС в 7% ПЭГ-6000 преципитатах сыворотки крови, с помощью способа-прототипа, выявлены ЛПНП и ЛПОНП и следы ЛП(а) (фиг.2а, б).

В группе больных ИБС в 7% ПЭГ-6000 преципитатах сыворотки крови, предлагаемым в качестве изобретения способом, кроме фракций ЛПНП, ЛПОНП в зоне между ЛПНП и ЛПОНП выявлены минорные фракции модифицированных ЛП(а) у 17 пациентов, а у 5 пациентов этой группы фракция ЛП(а) выявлена в виде низких (следовых) концентраций. После лечения фракции модифицированных ЛП были менее интенсивными (фиг.4а, б). Фракция ЛП(а) либо полностью отсутствовала, либо снижалась на 30% и более. Уровень ЛПВП крови после лечения возрастал до 30% и более, а холестерин ЛПВП увеличивался с 0,8 до 1,6 ммоль/л и более.

Пример 1

Пациент Г, 58 лет. История болезни №144. Поступил в отделение ИБС и атеросклероза НИИ кардиологии ТНЦ СО РАМН с жалобами на боли за грудиной и в области сердца, возникающие при физической нагрузке; боли купируются нитроглицеролом. Больного беспокоит одышка при физической нагрузке. АД 180/90 мм рт.ст., пульс в покое 68 ударов в минуту.

Диагноз: ишемическая болезнь сердца, стенокардия напряжения ФК II.

Результаты лабораторных исследований: ХС общий 9,3 ммоль/л; триацилглицерол 2,2 ммоль/л; ХС ЛПВП 0,9 ммоль/л, ЛПВП крови составил 15%.

Результаты электрофоретического исследования ЛП крови данного больного по способу-прототипу представлены на (фиг.3а), а по предлагаемому способу на (фиг.3б). Выявлены модифицированные ЛПНП, ЛПВП, ЛПОНП, ЛП(а) в низкой концентрации.

Пример 2

Больной Л, 54 года, история болезни №103, поступил в отделение ИБС и атеросклероза НИИ кардиологии г.Томска. Жалобы при поступлении на боли в области сердца колющего характера, иррадиирующие под лопатку. На ЭКГ выявлены рубцовые изменения в миокарде. Велоэргометрия была прекращена при нагрузке 75 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 7,6 ммоль/л, триацилглицериды 1,9 ммоль/л, ХС ЛПВП 1,0 ммоль/л, ЛПВП крови составил 13%.

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

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

После проведенного лечения результаты лабораторного исследования: ХС общий 6,4 ммоль/л, триацилглицериды 1,4 ммоль/л, ХС ЛПВП 1,5 ммоль/л, ЛПВП крови составил 28%.

При электрофоретическом исследовании ЛП 7% ПЭГ-6000 преципитата сыворотки крови фракции ЛП не выявлены. Фиг.6а содержит только линию старта.

Диагноз при выписке: ишемическая болезнь сердца, стенокардия напряжения, ФКII. Заключение: лечение эффективное.

Пример 3

Больной И, 54 года, история болезни №131, поступил в отделение ИБС и атеросклероза НИИ кардиологии г.Томска с жалобами на боли в области сердца, иррадиирующие под лопатку. На ЭКГ явления ишемии миокарда. Велоэргометрия прекращена при нагрузке 50 Вт по причине загрудинной боли и одышки. АД 120/110 мм рт.ст., пульс в покое 67 уд. в мин. Боли купируются нитроглицерином.

Результаты лабораторного исследования: ХС общий 8,8 ммоль/л, триацилглицериды 1,6 ммоль/л, ХС ЛПВП 0,9 ммоль/л, ЛПВП крови составил 17%.

Результаты электрофоретического исследования ЛП 7% ПЭГ-6000 преципитата сыворотки крови выявили наличие мЛПНП, мЛПОНП и мЛП(а) (фиг.6б). Результаты денситометрии мЛП: мЛПНП - 72%, мЛПОНП - 20 и мЛП(а) - 8%.

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

После проведенного лечения результаты лабораторного исследования: ХС общий 6,3 ммоль/л, триацилглицериды 1,3 ммоль/л, ХС ЛПВП 1,6 ммоль/л, ЛПВП крови составил 32%.

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

Результаты денситометрии мЛП: мЛПНП - 76%, мЛПОНП - 22 и мЛП(а) - 2%.

Диагноз при выписке: ишемическая болезнь сердца, стенокардия напряжения, ФКП. Снижение уровня мЛП(а) на 65% и увеличение ЛПВП крови на 86% по сравнению с исходным свидетельствовало об эффективности лечения ишемической болезни сердца.

Итак, при применении способа-прототипа оценка эффективности лечения ишемической болезни сердца проводилась по клинической картине заболевания и уровню липидов крови без выявления мЛП, что свидетельствовало о недостаточной точности способа. Оценка эффективности терапии по способу-прототипу не превышала 34%.

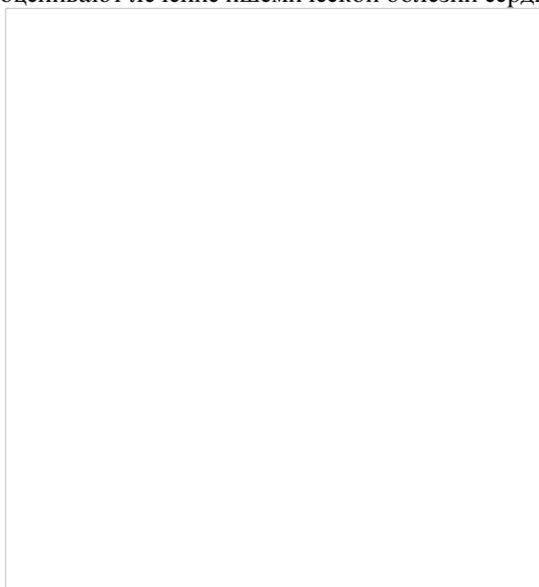
У других 29 больных ИБС точность определения эффективности лечения ишемической болезни сердца составила 100%, т.к. после лечения фракция мЛП(а) либо не выявлялась, либо снижалась на 30% и более, а уровень ЛПВП крови возрастал до 30% и более при росте холестерина ЛПВП с 0,8 до 1,6 ммоль/л и более. Способ применен у 51 пациента и 10 человек в группе контроля.

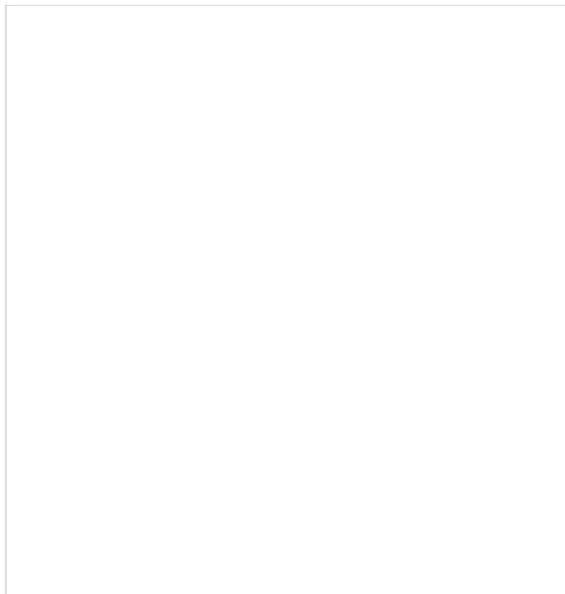
Применение предлагаемого способа определения эффективности лечения ишемической болезни сердца в отличие от способа-прототипа позволило выявить дополнительную фракцию модифицированных ЛП(а), оценить ее снижение одновременно с ростом ЛПВП и холестерина ЛПВП после проведенной курсовой терапии ИБС и повысить точность способа. С помощью способа-прототипа такие результаты получить не удалось, т.к. фракцию мЛП(а) выявить было невозможно ни до, ни после лечения. Ложноположительных случаев оценки эффективности лечения ИБС не наблюдалось. При этом предлагаемый способ прост в использовании и интерпретации полученных результатов и может быть внедрен в клиническую практику.

Детергент	Концентрация	Время инкубации	Температура Цельсия	Градусов	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		-

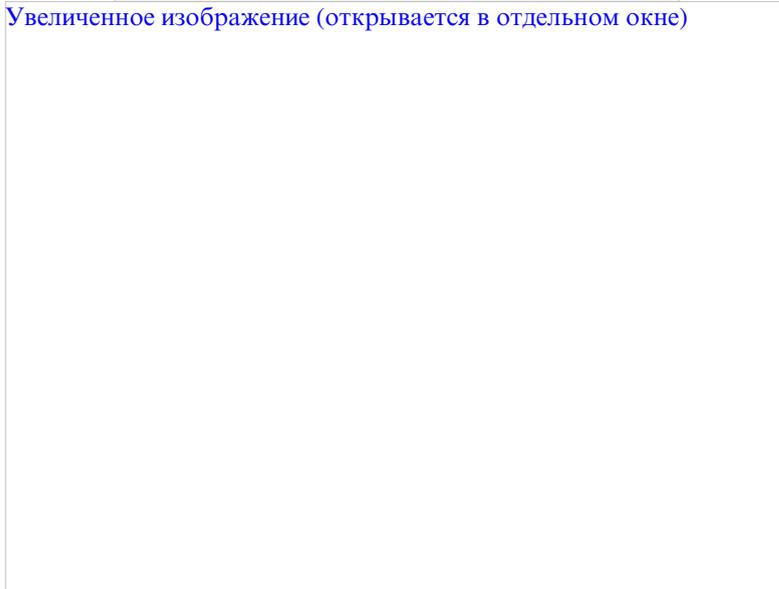
Формула изобретения

Способ оценки эффективности лечения ишемической болезни сердца путем исследования липидов сыворотки крови, отличающийся тем, что дополнительно определяют до и после лечения модифицированные ЛП(а) путем обработки 0,6 мл сыворотки крови 0,2 мл 0,1%-ным раствором Тритона X-100, инкубацией 15 мин при 20°C, перемешиванием смеси методом встряхивания 120 раз в мин, дезинтеграцией, с последующим добавлением 7%-ного раствора полиэтиленгликоля 6000, инкубацией с красителем Суданом Б при 40°C в течении 1 ч с последующим электрофоретическим разделением ЛП в геле агарозы в лунке 4x20 мм и при снижении уровня модифицированных ЛП(а) на 30% и более и увеличением в крови уровня ЛПВП до 30% и более, холестерина ЛПВП с 0,8 до 1,6 ммоль/л и более по сравнению с исходным уровнем оценивают лечение ишемической болезни сердца как эффективное.





[Увеличенное изображение \(открывается в отдельном окне\)](#)



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](#)