



УКРАЇНА

(19) UA (11) 58648 (13) U
(51) МПК
A61B 5/02 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ДЕСТРУКЦІЇ ЕНДОТЕЛІАЛЬНИХ ЧАСТИН В КРОВ'ЯНОМУ РУСЛІ

1

2

(21) u201008819

(22) 15.07.2010

(24) 26.04.2011

(46) 26.04.2011, Бюл.№ 8, 2011 р.

(72) КАЙДАШЕВ ІГОР ПЕТРОВИЧ, КУЦЕНКО НЕЛЯ ЛЕОНІДІВНА, САВЧЕНКО ЛЮДМИЛА ГАВРИЛІВНА, КУЦЕНКО ЛАРИСА ОЛЕКСАНДРІВНА, КАЙДАШЕВА ЄЛЬВІРА ІЛЛІВНА, СОЛОХІНА ІНГА ЛЕОНІДІВНА, МАМОНТОВА ТЕТЯНА ВАСИЛІВНА
(73) ВИЩИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД УКРАЇНИ "УКРАЇНСЬКА МЕДИЧНА СТОМАТОЛОГІЧНА АКАДЕМІЯ"

(57) Спосіб визначення деструкції ендотеліальних частин в кров'яному руслі шляхом осадження тромбоцитів плазми крові, з подальшим аналізом експресії антигенів ендотеліоцитів в надосадовій рідині на проточному цитофлюориметрі, який відрізняється тим, що як антитіла використовуються два типи моноклональних антитіл проти поверхневих специфічних антигенів ендотеліоцитів CD32 та CD40, мічених різними флюорисцентними барвниками.

Корисна модель, що заявляється відноситься до області медицини та може бути використаний в кардіології та ендокринології, та інших спеціальностей.

Унікальне розташування ендотеліоцитів на межі тканин та кровотоку є підґрунтям прямого агресивного впливу різноманітних патогенних факторів в кровотоці на стан цих клітин. Саме ці клітини першими сприймають атаку реактивних вільних радикалів, гіперхолістеринемії, високого гідростатичного тиску в судинах, гіперглікемії. Всі ці фактори призводять до пошкодження ендотелію судин, а саме підвищення вмісту циркулюючих ендотеліоцитів та їх фрагментів [Панина І.Ю. Особенности функции эндотелия при хронической болезни почек. Обзор литературы и собственные данные / И.Ю. Панина, А.Ш. Румянцева, М.А. Мешутина и др. //Нефрология. - 2007. - №11(4).- С.28-42., Шишкин А.Н. Эндотелиальная дисфункция, метаболический синдром и микроальбуминурия / А.Н. Шишкин, М.Л. Лындина // Нефрология. - 2009. - №3 (13).-С.24-32.]. В зв'язку з цим актуальним є розробка та впровадження в клінічну практику лабораторних показників для оцінки стану ендотелію у хворих.

Відомо ряд способів діагностики ендотеліальної дисфункції у пацієнтів з патологією внутрішніх органів. На підставі результатів, проведених в США, показано, що жінки з надлишковою вагою та ожирінням, які мають більш ніж 1 фактор ризику серцево-судинної патології, мають ендотеліальну

дисфункцію, яку визначали за допомогою реактивної гіперемії [Lippincott M.F. Relation of endothelial function to cardiovascular risk in women with sedentary occupations and without known cardiovascular disease / M.F. Lippincott, A. Carlow, A. Desai et al. // Am. Coll. Cardiol.- 2008.-Vol.102, №3.-P.643-647.]. Доведена дисфункція ендотелію для периферійної, коронарної мікро- і макроциркуляції та ниркового кровотоку при артеріальній гіпертензії, досліджуючи секрецію NO та синтез продуктів циклооксигеназної реакції - констрикторних агентів [Шумаков О.В. Відновлення функції ендотелію після інфаркту міокарда у хворих з артеріальною гіпертензією / В.О.Шумаков, І.Е.Малиновська, Л.П.Терешкевич та ін. // Укр. кардіологічний журнал.-2008.-№6.-С.36-41.].

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб визначення специфічних антигенів ендотеліоцитів - CD31 [Ельчанинова С.А. Маркеры повреждения эндотелия как возможный - критерий эффективности лечения артериальной гипертензии / Ельчанинова С.А., Кореняк Н.А., Дряпина И.В. и др. // Клиническая лабораторная диагностика.-2007.-№2.-С.40-42.]. Суть цього способу полягає в тому, що визначали ендотеліальні мікрочастинки, які утворюються з фрагментів клітинних мембран ендотеліоцитів розміром 1,5-4 мкм, досліджуючи експресію CD31(PE-CAM-1) в надосадовій рідині після агрегації тромбоцитів плазми крові..

(19) UA (11) 58648 (13) U

Недоліком існуючого способу є визначення відносно специфічного одного антигену ендотеліоцитів. Використання одного типу моноклональних антитіл не завжди дає об'єктивну інформацію про ту або іншу популяцію клітин, так як кожна клітина несе на своїй поверхні одночасно декілька типів антигенів, а один і той же антиген може експресуватися декількома типами клітин одного організму. Антитіла до CD31 зв'язуються із моноцитами, тромбоцитами, гранулоцитами, ендотеліоцитами, окремими популяціями лімфоцитів.

В основу корисної моделі поставлена задача створити спосіб визначення деструкції ендотеліальних частин в кров'яному руслі, шляхом удосконалення відомого, використовуючи одночасно два типи моноклональних антитіл проти поверхневих антигенів ендотеліальних клітин. При цьому виявляються специфічні ендотеліальні частинки серед іншої популяції клітин та їх обломків, що також можуть експресувати на своїй поверхні той чий інший антиген, характерний для ендотеліальних клітин.

Поставлена задача вирішується шляхом створення способу визначення деструкції ендотеліальних частин в кров'яному руслі, шляхом осадження тромбоцитів плазми крові, з послідовним аналізом надосадової рідини на проточному цитофлуориметрі, який відрізняється тим, що в якості антитіл використовуються два типи моноклональних антитіл проти поверхневих специфічних антигенів ендотеліоцитів, мічених різними флуорисцентними барвниками.

Запропонований спосіб дозволяє високоспецифічно виявляти ендотеліальні мікрочастинки як один із перспективних маркерів пошкодження ендотелію при серцево-судинній патології, що суттєво підвищить ефективність діагностично-прогностичних заходів в кардіології та ендокринології.

Заявлений спосіб виконується наступним чином:

Концентрацію ендотеліальних мікрочастин визначали за методом J. Hladovec в нашій модифікації: кров з ліктьової вени отримували додаючи 3,8% трьохзаміщеного цитрату натрію у співвідношенні 1:9. Для отримання збагаченої тромбоцитами плазми відразу після взяття кров центрифугували при 1000 об./хв. протягом 10 хвилин. Потім до 2 мл отриманої плазми додавали 0,4 мл 2ММ

аденозиндифосфату динатрієвої солі, обережно перемішуючи протягом 10 хвилин, після чого центрифугували при 1000 об./хв. протягом 10 хвилин для осадження агрегатів тромбоцитів. В надосадовій рідині визначали CD32⁺CD40⁺ - мікрочастинки методом проточної цитофлуориметрії (EPIC LX-MCL (Beckman Coulter, США), використовуючи програму System II™ software. Для збудження флуорисценції використовували аргонний лазер з довжиною хвилі 488 нм. Додатково до флуорисцентних параметрів проводили реєстрацію прямого та бокового світлорозсіювання клітин. Для визначення фенотипу ендотеліальних мікрочастин периферичної крові були використані моноклональні антитіла (MкАТ) (мишині IgG) до поверхневих антигенів, які мічені різними флуорисцентними барвниками: до CD32 мічені фікоеретрином (RPE), до CD40 мічені флуорисцеїнізотіоціонатом (FITC). Антитіла до CD32 зв'язуються із моноцитами, гранулоцитами, В лімфоцитами, тромбоцитами, ендотеліоцитами. Антитіла до CD40 зв'язуються із В лімфоцитами, моноцитами, ендотеліоцитами, фібробластами, кератиноцитами. Для ізотипічного контролю використовували мишині IgG, кон'юговані FITC, RPE та PE-TR.

Враховуючи роль судинного ендотелію (порушення його функції) у прогресуванні серцево-судинних захворювань, нами були досліджені маркери пошкодження ендотеліоцитів (CD32⁺CD40⁺ - мікрочастинки) у хворих з метаболічним синдромом та цукровим діабетом. Показано, що у хворих з підтвердженим діагнозом метаболічного синдрому кількість CD32⁺CD40⁺ мікрочастинок була $4,54 \cdot 10^7$ /л, що двічі більше показників практично здорових осіб (Табл.). Підвищений рівень цих ендотеліальних мікрочастинок нами був виявлений і у пацієнтів з іншою судинною патологією (цукровий діабет 2 типу та в поєднанні з метаболічним синдромом), де одним із доведених патогенетичних механізмів розвитку є ендотеліальна дисфункція. Слід відмітити, що підвищений рівень CD32⁺CD40⁺ мікрочастинок корелював з підвищеною концентрацією великого ендотеліну в сироватці крові цих пацієнтів. Враховуючи, що цей попередник ендотеліну є маркером пошкодження ендотелію, слід стверджувати, що виявлений нами підвищений рівень CD32⁺CD40⁺ - мікрочастинок є маркером пошкодження ендотелію.

Таблиця

Дослідження ендотеліальної дисфункції у обстежених пацієнтів на момент госпіталізації (M±m)

Групи хворих	Ендотелій, фмоль/мл	Циркулюючі CD32 ⁺ CD40 ⁺ - мікрочастинки (• 10 ⁷ /л)
Практично здорові особи, (n=10)	0,1±0,05	2,1±0,2
Пацієнти з метаболічним синдромом, (n= 17)	0,32±0,16*	4,54±2,06*
Пацієнти з цукровим діабетом 2 типу, (n=17)	0,38±0,25*	4,57 ±1,9*
Пацієнти з цукровим діабетом 2 типу на фоні метаболічного синдрому, (n=17)	0,34±0,25*	4,55±1,97*

Примітки:

* - вірогідно щодо показників практично здорових осіб

Позитивний результат від заявленого способу визначення деструкції ендотеліальних частин в кров'яному руслі полягає у виявленні мікрочастинок серед ендотеліоцитів, які на своїй поверхні

одночасно експресують два специфічних антигена CD32 та CD40. Таким чином, визначення CD32⁺CD40⁺ - мікрочастинок - є специфічним маркером пошкодження ендотеліоцитів.