



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: [2011133430/15](#), 09.08.2011(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
09.08.2011

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 09.08.2011

(45) Опубликовано: [27.02.2013](#) Бюл. № 6

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2398239 C1, опубл. 27.08.2010. MOTTA M. et al. The significance of apolipoprotein-B (Apo-B) in the elderly as a predictive factor of cardio-cerebrovascular complications. Arch Gerontol Geriatr. 2009 Jul-Aug; 49(1):162-4. Epub 2008 Aug 13. Найдено из БД PubMed, PMID: 18701171. МЕТЕЛЬСКАЯ В.А. и ПЕРОВА Н.В. Современные основы диагностики и коррекции атерогенных дислипидемий. Кардиология. Опубликовано 15.09.2008.

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),
Башкова Ирина Борисовна (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 ДИАГНОСТИКИ ЛИПИДЕМИИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине и может быть использовано в кардиологии и терапии. Способ включает трехкратное замораживание и оттаивание сыворотки крови пациента и последующее определение аполипротеина В, липопротеина (а) и их соотношения. Если соотношение составляет 20,5 и менее - выявляют раннюю стадию липидемии. Использование предлагаемого способа повышает точность диагностики липидемии. Способ прост в осуществлении и интерпретации полученных результатов. 1 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. - Питер, пресс, с.98-102).

Известны способы разделения на фракции липопротеинов (ЛП) в полиакриламидном геле (Н.Н.Шацкая. Биохимические исследования в оценке состояния сердечно-сосудистой системы. В кн. «Методы исследований в профпатологии», Москва, 1988, с.95-97).

Известны также способы разделения на фракции ЛП путем электрофореза в геле агарозе (Лаб. методы исследования / под редакцией В.В.Меньшикова. М.: Медицина, 1987, с.248-249), SU 1720015 А, 15.03.1992. RU 2063040 С1, 27.06.1996. RU 2115121 С1, 10.07.1998. RU 2097038 С1, 27.11.1997. RU 2060034 С1, 20.05.1996. EP 0074610 А, 23.03.1983.

Недостатком данных способов является то, что они не позволяют выявить все фракции апопротеинов, а именно аполипопротеинов В и липопротеинов (а). Под липопротеином (а) понимают аполипопротеин (а), т.е. апо-белок липопротеина (а) (ЛП (а)). Термин используется в каталогах к реагентам биохимического анализатора Konelab (Финляндия) для определения апо-белка ЛП (а). Поэтому в описании способа в связи с применяемым методом анализа используется термин липопротеин (а) вместо

аполипротеина (а).

Известен способ определения фракции липопротеинов у больных ишемической болезнью сердца (RU 2400751 С1, 27.09.2010).

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 аполипротеин В и липопротеин (а). Это связано с тем, что липопротеин (а), с одной стороны, является наиболее атерогенным, а с другой - в норме выявляется в очень низкой концентрации и увеличивается в крови при липидемии атерогенного генеза. Следовательно, для ранней диагностики заболевания особенно важно выявление липопротеина (а) наряду с максимально полным определением аполипротеина В и соотношения аполипротеина В к липопротеину (а).

Целью предлагаемого изобретения является повышение точности и эффективности способа.

Указанная цель достигается тем, что сыворотку крови перед исследованием обрабатывают трехкратным замораживанием и оттаиванием по 20 минут и 10 минут соответственно, а затем методом иммунопреципитации определяют аполипротеин В, липопротеин (а) и их соотношение, и если оно составляет менее 20,5 выявляют раннюю стадию липидемии.

Новым в данном способе является предварительная обработка сыворотки крови трехкратным замораживанием и оттаиванием по 20 минут и 10 минут соответственно, что позволяет определить максимальную концентрацию аполипротеина В и липопротеина (а) и их соотношение для диагностики ранней липидемии.

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

Каждый вновь введенный в формулу изобретения признак выполняет функцию повышения точности и эффективности способа. Трехкратное замораживание 0,5 мл сыворотки крови с последующим трехкратным оттаиванием в течение 20 минут и 10 минут соответственно позволяет максимально выявить содержание аполипротеина В и липопротеина (а) для диагностики липидемии.

Исследование аполипротеинов и липопротеинов разных классов при диагностике липидемии и ишемической болезни сердца (ИБС) рекомендовано Всероссийским научным обществом кардиологов согласно положению рекомендаций Европейского общества по изучению атеросклероза - «Диагностика и коррекция нарушения 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 и липопротеинов. В лабораторной практике все больше используются прямые методы определения липопротеинов (ЛП) и их аполипротеинов, а именно методы иммунопреципитации.

Увеличение концентрации ЛП abnormal или ЛП (а) и его аполипротеина (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), холестерина (ХС) и ХС ЛПНП - в пять раз (J.A. M.A. - 2001. - Vol.285. - p.2486-2497, Eur. Heart. J. - 2003. - Vol.24. - p.1601-1610).

Липопротеин (а) является предиктором атеросклероза, свидетельствует о генетической предрасположенности к сердечно-сосудистым заболеваниям, фатальному и нефатальному инфаркту миокарда и ишемическому инсульту.

В настоящее время особое внимание уделяется исследованию фракции липопротеина (а) в связи с чем разрабатываются способы лабораторной диагностики, позволяющие в максимальной концентрации 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 II^a, II^b типами гиперлипопротеинемий, 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 иммунопреципитации при исследовании липопротеина (а) и аполипротеина В позволяет наиболее точно определить уровень этих липопротеинов в крови.

Обработка 0,5 мл сыворотки крови методом трехкратного замораживания и оттаивания позволяет определить максимальную концентрацию аполипротеинов в крови пациента.

Усовершенствование способа касается трехкратного замораживания и оттаивания по 20 минут и 10 минут соответственно крови пациента с последующим определением аполипротеина В, липопротеина (а) и их соотношения.

Указанное выше время обработки сыворотки пробы является оптимальным. Проведение этой процедуры менее 20 минут и 10 минут или более 20 минут и 10 минут соответственно не улучшает результатов исследования аполипротеинов.

Поскольку липопротеин (а) наиболее атерогенен, очень важно на ранних стадиях заболевания выявлять максимальное содержание в крови липопротеина (а). Это позволяет диагностировать липидемию при ишемической болезни 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 липопротеина (а) для оценки эффективности терапии заболевания и прогнозирования течения липидемии при ишемической болезни сердца.

Все сказанное свидетельствует о крайней важности разработки способов лабораторной диагностики, позволяющих наиболее полно выявлять липопротеин (а), а также аполипротеин В.

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

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

Данное изобретение может быть использовано в практическом здравоохранении для повышения точности диагностики у больных ИБС.

Таким образом, следует считать данное техническое решение соответствующим условиям патентоспособности: «Новизна», «Изобретательский уровень», «Промышленная применимость».

Способ осуществляется следующим образом поэтапно:

1. 0,5 мл сыворотки крови трехкратно замораживают и оттаивают по 20 минут и 10 минут соответственно;
2. В сыворотке крови пациента определяют липопротеин (а) с помощью набора для Konelab (Код 981915).

Методика определения основана на измерении иммунопреципитации, усиленной полиэтиленгликолем (ПЭГ), при длине волны 340 нм. В анализатор Konelab устанавливается исследуемый образец сыворотки крови пациента либо образец сыворотки крови, разведенный разбавителем для образца в 2 раза в случае высокой концентрации липопротеина (а) в крови. Затем устанавливается реактив с буферным раствором, содержащий избыток специфической антисыворотки. В анализаторе автоматически проводится исследование пробы сыворотки крови пациента. Регистрируется увеличение поглощения света, вызванное иммунопреципитацией. Изменение светопоглощения пропорционально концентрации липопротеина (а), содержащегося в сыворотке крови пациента. Анализатор Konelab автоматически готовит серию из стандартного калибратора липопротеина (а) (код 981916) в соответствии с установленными параметрами. Калибровочная кривая строится исходя из значений, полученных при измерении отклика калибраторов с применением сплайнового сглаживания. Результат исследования пробы сыворотки крови пациента после ее реакции с антисывороткой к липопротеину (а) появляется на калибровочной кривой в виде точки. По горизонтали на графике указывается концентрация

липопротеина (а) в мг/л, а по вертикали - абсорбция (А). Следовательно, определяется значение абсорбции пробы, которая в автоматическом режиме обозначается результирующей концентрацией липопротеина (а), выраженной в мг/л. Выполнение анализа возможно вплоть до концентрации 8100 мг/л (8,1 г/л) липопротеина (а) и минимальном значении 30 мг/л.

Установленное значение нормы липопротеина (а) 31-150 мг/л. При липидемии атерогенного генеза уровень липопротеина (а) увеличивается в диапазоне 310-4200 мг/л (0,3-4,2 г/л).

Сравнительное исследование проводилось в соответствии с NCCLS документом EP-9A с использованием коммерческой нефелометрической методики, которая служила в качестве эталона с концентрацией липопротеина (а) в образцах 69-1622 мг/л.

3. В сыворотке крови пациента определяют аполипопротеин В с помощью набора для Konelab (Код 981663).

Методика определения основана на измерении иммунопреципитации, усиленной полиэтиленгликолем (ПЭГ), при длине волны 340 нм. В анализатор Konelab устанавливается исследуемый образец сыворотки крови пациента либо образец сыворотки крови, разведенный разбавителем для образца в 2 раза в случае высокой концентрации аполипопротеина В в крови. Затем устанавливается реактив с буферным раствором, содержащий избыток специфической антисыворотки. В анализаторе автоматически проводится исследование пробы сыворотки крови пациента. Регистрируется увеличение поглощения света, вызванное иммунопреципитацией. Изменение светопоглощения пропорционально концентрации аполипопротеина В, содержащегося в сыворотке крови пациента. Анализатор Konelab автоматически готовит серию из стандартного калибратора апо А-1/В: лиофилизированного, на основе человеческого материала (концентрация аполипопротеина В в восстановленном калибраторе указана на этикетке флакона). Калибровочная кривая строится исходя из значений, полученных при измерении отклика калибраторов с применением сплайнового сглаживания. Результат исследования пробы сыворотки крови пациента после ее реакции с антисывороткой к аполипопротеину В появляется на калибровочной кривой в виде точки. По горизонтали на графике указывается концентрация аполипопротеина В в г/л, а по вертикали абсорбция (А). Следовательно определяется значение абсорбции пробы, которая в автоматическом режиме обозначается результирующей концентрацией аполипопротеина В, выраженной в г/л. Выполнение анализа возможно вплоть до концентрации аполипопротеина В, равной 13,1 г/л при минимальном значении 0,05 г/л.

Установленное значение нормы для м 0,63-1,88 г/л, для ж 0,56-1,82 г/л, при липидемии атерогенного генеза уровень аполипопротеина В увеличивается в диапазоне 1,9-13,1 г/л.

Сравнительное исследование проводится в соответствии с инструкцией к анализатору NCCLS документом EP-9A с использованием коммерческой нефелометрической методики, которая служила в качестве эталона с концентрацией аполипопротеина В в образцах 0,4-2,21 г/л.

Для более точной характеристики ранней стадии липидемии впервые было определено отношение аполипопротеина В к липопротеина (а) как наиболее атерогенной фракции липопротеинов.

Установлено нормально значение отношения аполипопротеина В к липопротеину (а), превышающее 20,6. Значение этого соотношения снижается при липидемии и становится меньше 20,5.

Описываем возможные осложнения при выполнении исследования и способы их устранения.

Предотвращение возможных ложноположительных и ложноотрицательных результатов связано с предельно точным выполнением методов исследования. Ложноположительный результат возможен крайне редко и может быть обусловлен только нарушением техники разведения сыворотки крови при высокой концентрации в ней липидов. Перед установкой реагентов на борт анализатора Konelab необходимо удостовериться в отсутствии пузырьков во флаконах и на поверхности реагентов.

Для подтверждения работоспособности работы предлагаемого способа и достижения технического результата были обследованы группа-контроля (n=10) и группа больных ишемической болезнью сердца (ИБС), т.к. в основе патогенеза ИБС лежит липидемия атерогенного генеза (n=20). Обе группы обследованы с помощью предлагаемого способа и способа-прототипа. В группе контроля в случае использования способа прототипа и предлагаемого способа липопротеины (а) не выявлены, либо выявлены в минимальной концентрации.

В группе больных ИБС выявлены липопротеины низкой и очень низкой плотности, липопротеины (а), но аполипопротеины не определяются. Липидемия атерогенного генеза выявлена в 60% случаев, т.е. у 12 пациентов из 20 больных ИБС.

В группе больных ИБС, обследованных по предлагаемому способу, определены аполипопротеины В, липопротеины (а) с расчетом их соотношения, значительно

сниженного по сравнению с нормой, т.е. значительно ниже 20,5. Липидемия выявлена у 19 из 20 обследованных пациентов на самых ранних стадиях заболевания.

Пример: Пациент В., 57 лет, жалобы при поступлении на боли за грудиной и в области сердца, возникающие при физической нагрузке. Боли купируются нитроглицеролом. Больного беспокоит отдышка 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: Холестерол общий 7,3 ммоль/л, 3-ацил-глицерол 1,5 ммоль/л, ХС ЛПВП 0,9 ммоль/л, ХС ЛПНП 6,3 ммоль/л, ХС ЛПОНП 0,68 ммоль/л, аполипопротеин В 4,4 г/л, липопротеин (а) 0,35 г/л, отношение аполипопротеина В к липопротеину (а) 12,6.

Диагноз: липидемия (гиперхолестероломия), ишемическая болезнь сердца, стенокардия напряжения, ФК II-III.

Предлагаемый способ позволяет выявить даже ранние стадии липидемии атерогенного генеза.

Применение предлагаемого способа диагностики липидемии в отличие от способа прототипа позволило выявить липидемию атерогенного генеза в 95% случаев ИБС, т.к. были исследованы наиболее атерогенные аполипопротеины самым точным способом иммуноприципитации.

При этом предлагаемый способ прост в использовании и интерпретации полученных результатов.

Формула изобретения

Способ диагностики липидемии путем исследования липопротеинов сыворотки крови, отличающийся тем, что дополнительно перед исследованием проводят трехкратное замораживание и оттаивание сыворотки крови по 20 мин и 10 мин соответственно, а затем определяют аполипопротеин В, липопротеин (а) и их соотношение, и, если оно составляет 20,5 и менее, выявляют раннюю стадию липидемии.

ИЗВЕЩЕНИЯ

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

Дата прекращения действия патента: 10.08.2013

Дата публикации: [10.07.2014](#)