



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2009121616/15, 08.06.2009

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
08.06.2009

(45) Опубликовано: 27.12.2010 Бюл. № 36

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **БИЛЕНКО М.В. и др. Продукция активных форм кислорода моноцит-производными макрофагами из крови здоровых доноров и больных ИБС. Биомедицинская химия, 2008, т.54, вып.4, с.445-453, реф. [найдено в Интнет: www.ibmc.msk.ru]. М.В.БИЛЕНКО и др. Окисление и потребление ЛПНП моноцит-производными макрофагами из крови больных ИБС. Биомедицинская химия, (см. прод.)**

Адрес для переписки:

119121, Москва, ул. Погодинская, 10, ИБМХ
РАМН, кор.1, комн.209, Е.Г. Тихоновой

(72) Автор(ы):

**Биленко Марианна Владимировна (RU),
Владимиров Юрий Андреевич (RU),
Хильченко Алексей Валерьевич (RU),
Павлова Светлана Александровна (RU)**

(73) Патентообладатель(и):

**Учреждение Российской академии
медицинских наук Научно-
исследовательский институт
биомедицинской химии имени В.Н.
Ореховича РАМН (ИБМХ РАМН) (RU)**

(54) СПОСОБ ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ ТЯЖЕСТИ ИШЕМИЧЕСКИХ ПОВРЕЖДЕНИЙ СЕРДЦА У БОЛЬНОГО С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА И ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ БОЛЬНОГО К ПРОГРЕССИРОВАНИЮ АТЕРОСКЛЕРОЗА

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, в частности к кардиологии, и касается способа экспресс-диагностики тяжести ишемического повреждения сердца и предрасположенности больного с ишемической болезнью сердца (ИБС) к прогрессированию атеросклероза. Сущность способа заключается в том, что проводят оценку степени стимуляции атерогенной функции моноцит-производных макрофагов из крови больных с ИБС по способности макрофагов а) продуцировать активные формы кислорода, оцененные по величине люминол-зависимой

хемилюминесценции, б) окислять липопротеины низкой плотности, оцененные по накоплению в них продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, в) поглощать липопротеины низкой плотности, оцененные по накоплению в макрофагах общего холестерина и г) по сохранению 50-70% жизнеспособных макрофагов в процессе 1 часа инкубации в безбелковой субстрат-дефицитной среде. Использование способа позволяет оценить тяжесть ишемического повреждения сердца и предрасположенности больного с ИБС к прогрессированию атеросклероза.

(56) (продолжение):

2008, т.54, вып.3, с.322-340, реф. [найдено в Интнет: www.ibmc.msk.ru]. **БИЛЕНКО М.В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов (молекулярные механизмы, пути**

предупреждения и лечения. - М.: Медицина, 1989, 368 с. CHEUK-MAN YU et al. Expression of macrophage migration inhibitory factor in acute ischemic myocardial injury. J.Histochem, 2003, v.51 (5), p.625-631.

R U 2 4 0 8 0 1 9 C 1

R U 2 4 0 8 0 1 9 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION(21), (22) Application: **2009121616/15, 08.06.2009**(24) Effective date for property rights:
08.06.2009(45) Date of publication: **27.12.2010 Bull. 36**

Mail address:

**119121, Moskva, ul. Pogodinskaja, 10, IBMKh
RAMN, kor.1, komn.209, E.G. Tikhonovoj**

(72) Inventor(s):

**Bilenko Marianna Vladimirovna (RU),
Vladimirov Jurij Andreevich (RU),
Khil'chenko Aleksej Valer'evich (RU),
Pavlova Svetlana Aleksandrovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Uchrezhdenie Rossijskoj akademii meditsinskih
nauk Nauchno-issledovatel'skij institut
biomeditsinskoj khimii imeni V.N. Orekhovicha
RAMN (IBMKh RAMN) (RU)****(54) INSTANT SEVERITY DIAGNOSIS OF ISCHEMIC HEART DAMAGE IN PATIENT WITH CHRONIC HEART DISEASE AND PROPENSITY FOR PROGRESSING ATHEROSCLEROSIS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: extent of atherogenesis stimulation of monocyte-derived macrophages from the CHD patient's blood is measured by the ability of macrophages a) to produce active oxygen forms evaluated by luminol-dependent chemoluminescence, b) to oxidise low-density lipoproteins evaluated by uptake of the thiobarbiturate acid reacting products,

c) to absorb low-density lipoproteins evaluated by total cholesterol uptake in macrophages and d) to preserve 50-70% of viable macrophages for 1 hour of incubation in a protein-free substratum-deficient medium.

EFFECT: use of the technique allows measuring the severity of ischemic heart damage and propensity of a CHD patient for progressing atherosclerosis.

1 ex

Изобретение относится к медицине, в частности кардиологии, патофизиологии, гематологии, фармакологии, и касается способа экспресс-диагностики тяжести ишемических повреждений сердца у больного с ишемической болезнью сердца (ИБС) и предрасположенности больного с ИБС к прогрессированию атеросклероза.

5 Известно, что ИБС наряду с онкологическими заболеваниями является наиболее частой причиной смертности людей пожилого и среднего возраста. ИБС - термин, объединяющий такие патологические состояния, как острый инфаркт миокарда (ОИМ), болезнь коронарных сосудов, стабильная стенокардия (покоя) и нестабильная
10 стенокардия (напряжения), острый коронарный синдром, гипертония, гиперхолестеринемия и другие. В настоящее время известно, что ИБС является опасным фактором «риска» возникновения и прогрессирования атеросклероза, так как сопровождается выбросом в ткани и кровь ФНО- α , IL 1-6, и других
15 провоспалительных и вазоактивных факторов, активных форм кислорода (АФК), продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), а также возникновением генерализованной гипоксии и множественных очагов ишемии. Гипоксия и ишемия ведут к интенсификации процессов ПОЛ в самих очагах нарушения кровообращения, росту продуктов ПОЛ в циркулирующей крови, а также к повреждению ими стенки
20 сосудов. Этот факт был квалифицирован как «Открытие» [1] и впоследствии подтвержден многочисленными публикациями [2-5].

Высокое содержание у больных ИБС вышеуказанных факторов «риска» существенно способствует стимуляции атерогенной функции моноцит-производных макрофагов [6, 7], превращая неактивные (интактные) клетки в престоимированные,
25 а затем и в стимулированные клетки, способные активно продуцировать АФК, окислять, связывать и поглощать липопротеины низкой плотности (ЛПНП), что ведет к трансформации макрофагов в нестабильные пенные клетки (foam cells), являющиеся основой возникновения атеросклероза - субинтимальных полосок и
30 атеросклеротических бляшек [8, 9].

Известен способ оценки тяжести течения ИБС и определения показаний к антиоксидантной терапии у больных ИБС, заключающийся в том, что разведенную стандартным буферным раствором плазму крови пациента окисляют водным
35 раствором $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и через 4 и 24 часа инкубации регистрируют накопленное количество продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-реактивных продуктов), в пересчете на 1 мл неразведенной плазмы, а при значениях выше 70 (4 часа) и 100 (24 часа) моль/мл констатируют высокий риск осложненного течения ИБС и необходимость дополнительной антиоксидантной терапии [10]. Однако этот метод
40 регистрирует не *in vivo*, а экзогенно (CuSO_4) окисленные ЛПНП и другие находящиеся в плазме крови липиды, что может быть связано не только с ишемическим повреждением сердца, но и с другими воспалительными заболеваниями.

Таким образом, в настоящее время остается актуальной проблема оценки тяжести ИБС и предрасположенности больных ИБС к прогрессированию атеросклероза, а
45 также проблема контроля за эффективностью применения профилактических и лечебных препаратов, скрининга и доклинических испытаний новых противоишемических, антирадикальных и антиатеросклеротических средств.

Результаты наших исследований показали, что макрофаги, полученные из моноцитов крови больных ИБС (МФиБс), являются уже *in vivo* престоимированными
50 или стимулированными клетками, что в условиях их инкубации с ЛПНП *in vitro* проявляется их более выраженной способностью продуцировать активные формы кислорода, окислять и потреблять ЛПНП по сравнению с макрофагами, полученными

из моноцитов крови здоровых доноров (МФ_H). Чем тяжелее степень ИБС, тем выше *in vivo* стимуляция моноцит-производных макрофагов. Так, например, в группе больных ИБС со стабильной стенокардией I-II функционального класса продукция АФК, оцененная по интенсивности ХЛ, была выше в 1,2-1,5 раза, а в группе больных ИБС со стабильной стенокардией III-IV функционального класса - в 2 и более раза по сравнению с ХЛ МФ, взятых от здоровых доноров.

Эти результаты явились основанием для создания предлагаемого способа экспресс-диагностики тяжести ишемических повреждений у больных ИБС,

предрасположенности больных ИБС к прогрессированию атеросклероза.

В основе описываемого способа использована культура моноцит-производных макрофагов из крови кубитальной вены больных ИБС и крови здоровых доноров, и ЛПНП из плазмы крови здоровых доноров. Определение атерогенной активности макрофагов различными методами, такими как усиление продукции активных форм кислорода, аккумуляция в ЛПНП ТБК-реактивных продуктов (ТБК-РП), аккумуляция в макрофагах общего холестерина (ОХ), снижения жизнеспособности макрофагов, расширяет область применения модели и обеспечивает всестороннюю оценку полученных результатов.

В представленном изобретении описан способ экспресс-диагностики тяжести ишемических повреждений сердца и предрасположенности больного с ишемической болезнью сердца к прогрессированию атеросклероза, заключающийся в том, что проводят оценку степени стимуляции атерогенной функции моноцит-производных макрофагов из крови больных с ишемической болезнью сердца по способности макрофагов:

а) продуцировать активные формы кислорода, оценивая их по величине люминол-зависимой хемилюминесценции, достигающей до 0,8-1,0 V и зимозан-стимулированной хемилюминесценции, достигающей до 30-50 V,

б) окислять липопротеины низкой плотности, оцененные по накоплению в них ТБК-РП продуктов, достигающих до 0,6-0,8 нмоль МДА/мг белка,

в) поглощать липопротеины низкой плотности, оценивая величину накопления в макрофагах общего холестерина, достигающего до 10-15 нг/10⁶ макрофагов и

г) по снижению количества жизнеспособных макрофагов в процессе 1 часа инкубации в безбелковой субстрат-дефицитной среде, вплоть до 50-70%, и при вышеуказанных значениях, по меньшей мере одного из показателей, констатируют умеренную тяжесть повреждения сердца у больного с ишемической болезнью сердца и умеренную предрасположенность больного с ишемической болезнью сердца к прогрессированию атеросклероза, а при значениях, превышающих вышеуказанные, по меньшей мере для одного из показателей соответственно, констатируют тяжелую форму повреждения сердца у больного с ишемической болезнью сердца и высокую предрасположенность больного с ишемической болезнью сердца к прогрессированию атеросклероза.

Изобретение иллюстрируется следующими примерами

Пример I. Оценка способности моноцит-производных макрофагов продуцировать активные формы кислорода с помощью люминол-зависимой и зимозан-стимулированной ХЛ.

Из кубитальной вены больных ИБС берут натощак кровь в количестве 2-3 мл, разводят вдвое стандартным буфером (PBS). Кровяной раствор наслаивают на Ficoll Park в пропорции 3:5 мл/мл и центрифугируют 20 мин при 400g и 37°C. Отсасывают интерфазу и дважды отмывают, центрифугируя при 320g. Полученные из осадка

клетки разводят средой роста до концентрации 400000 клеток на 500 мкл на пластиковую пробирку, пробирку помещают в CO₂ инкубатор при 37°C на 20 часов с однократной сменой среды через 2 ч. По прошествии этого срока среду меняют на раствор Хэнкса с добавлением 20 мкм раствора люминола (рН=7,4) на пробирку.
 5 Пробирку помещают в гнездо хемилюминометра (LUM 5773) и в течение 2-3 минут записывают показания люминол-зависимой ХЛ (V) на мониторе компьютера, соединенном с хемилюминометром. Величина люминол-зависимой ХЛ у макрофагов, взятых из крови больных ИБС, превышала величину люминол-зависимой ХЛ
 10 макрофагов, взятых у здоровых доноров (0,53±0,06 V), на 50% и выше, составляя 0,8-1,0 V, что позволяло констатировать умеренную тяжесть повреждения сердца у больного ИБС и умеренную предрасположенность больного ИБС к прогрессированию атеросклероза. При значениях люминол-зависимой ХЛ, выше 1,0 V (1,1-2,0 V и выше) по сравнению с люминол-зависимой ХЛ макрофагов, взятых от
 15 здоровых доноров (0,53±0,06 V), констатируют тяжелую форму повреждения сердца у больного ИБС и высокую предрасположенность больного ИБС к прогрессированию атеросклероза.

Помимо люминол-зависимой ХЛ возможно использование более чувствительного
 20 метода, основанного на регистрации ХЛ, стимулированной опсонизированным зимозаном (ОЗ). В этом случае в пробирку, содержащую макрофаги и люминол, добавляют ОЗ в концентрации 0,1 мг/мл и проводят запись на мониторе до выхода кривой ХЛ на плато. Высоту максимума ХЛ определяют в V. Величина зимозан-стимулированной ХЛ макрофагов, взятых у больных ИБС, превышала зимозан-
 25 стимулированную ХЛ макрофагов из крови здоровых доноров (23,72±2,25V) на 50% и выше. При значениях зимозан-стимулированной ХЛ, равной 30-50 V, констатируют умеренную тяжесть повреждения сердца у больного ИБС и умеренную предрасположенность больного ИБС к прогрессированию атеросклероза, а при
 30 зимозан-стимулированной хемилюминесценции выше 50 V констатируют тяжелую форму повреждения сердца у больного ИБС и высокую предрасположенность больного ИБС к прогрессированию атеросклероза.

Средние данные в опытах с макрофагами здоровых доноров составляют:

35 Величина люминол-зависимой ХЛ равна 0,53±0,06 V

Величина зимозан-стимулированной ХЛ равна 23,72±2,25 V

Пример 2. Оценка способности моноцит-производных макрофагов окислять ЛПНП по накоплению в ЛПНП ТБК-РП, поглощать ЛПНП по аккумуляции в макрофагах
 40 общего холестерина и снижать свою жизнеспособность в процессе 1 часа инкубации в безбелковой субстрат-дефицитной среде.

Из кубитальной вены больных ИБС берут натощак кровь в количестве 2-3 мл, разводят вдвое стандартным буфером (PBS). Кровяной раствор наслаивают на Ficoll
 Park в пропорции 3:5 мл/мл и центрифугируют 20 мин при 400g и 37°C. Отсасывают
 45 интерфейс и дважды отмывают, центрифугируя при 320g. Полученные из осадка клетки разводят средой "роста" до концентрации 10⁶/мл, разливают по ячейкам пластиковой планшеты (Costar, the Netherlands) и инкубируют 20 часов в CO₂-инкубаторе со сменой среды 1 раз через 2 часа. В полученных культурах среду "роста" меняют на безбелковую и субстрат-дефицитную ("инкубационную") среду, добавляют
 50 в каждую ячейку 200 мкг белка ЛПНП, свежеполученных из плазмы крови здорового донора, и инкубируют в CO₂-инкубаторе в течение 1 часа. Затем среду вместе с ЛПНП отсасывают и определяют в них содержание ТБК-РП. Измерение ТБК-РП проводят на спектрофотометре (Beckman DU-7, USA) при максимуме поглощения 532 нм.

Количество ТБК-РП выражают через эквивалентное количество малонового диальдегида (МДА), используя коэффициент молярной абсорбции, равный $156000 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$. Результаты представляют в нмоль МДА на мг белка ЛПНП.

Жизнеспособность МФ_{ИБС} определяют по количеству клеток, оставшихся прикрепленными ко дну ячеек по окончании 1 часа инкубации. Клетки промывают PBS, отслаивают от дна ячейки (0,1% трипсин + 0,02% ЭДТА) и подсчитывают в камере Горяева.

Количество ОХ (характеризующее потребление ЛПНП макрофагами) оценивают в макрофагах, оставшихся прикрепленными ко дну ячейки после их инкубации с ЛПНП, т.е. в жизнеспособных клетках, их промывают PBS, заливают 96% этанолом, высушивают и замораживают при -20°C . Экстракцию липидов проводят смесью гексан-изопропанол (2:3 мл/мл). Содержание ОХ определяют, используя набор Boehringer (Boehringer Mannheim GmbH, Germany), как рекомендовано в инструкции. Количество ОХ в ячейке с макрофагами (нг ОХ) делят на количество жизнеспособных клеток (дублируют параллельную ячейку) и пересчитывают на 10 клеток.

Результаты сравнивают с полученными в опытах с макрофагами от здоровых доноров.

Средние данные в опытах с макрофагами здоровых доноров составляют:

ТБК-РП (нмоль МДА/мг белка ЛПНП) после 1 ч = $0,39 \pm 0,13$;

ОХ (нг ОХ $\cdot 10^6$ МФ_Н) в ЛПНП после 1 ч = $7,2 \pm 0,4$;

Жизнеспособные МФ_Н (%) после 1 ч = 85 ± 5 .

Превышение цифр аккумуляции ТБК-реактивных продуктов в ЛПНП или ОХ в макрофагах (и снижения числа жизнеспособных макрофагов) в опытах с МФ_{ИБС} по сравнению с показателями макрофагов от здоровых доноров на 50% расценивают как умеренную вплоть до умеренно резкой стимуляции, превышение цифр на 100% и более оценивают как резкую стимуляцию макрофагов, осложненную степень ИБС и склонность больного ИБС к прогрессированию атеросклероза.

Например, при накоплении в ЛПНП ТБК-реактивных продуктов до 0,6-0,8 нмоль МДА/мг белка, или аккумуляции в макрофагах ОХ до 10-15 нг/10⁶ макрофагов, или сохранении лишь 50-70% жизнеспособных макрофагов в процессе 1 часа инкубации в безбелковой субстрат-дефицитной среде, констатируют умеренную тяжесть повреждения сердца у больного с ишемической болезнью сердца и умеренную предрасположенность больного с ишемической болезнью сердца к прогрессированию атеросклероза, а при значениях, превышающих вышеуказанные, по меньшей мере для одного из показателей соответственно, констатируют тяжелую форму повреждения сердца у больного с ишемической болезнью сердца и высокую предрасположенность больного с ишемической болезнью сердца к прогрессированию атеросклероза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Биленко М.В., Алесенко А.В., Бурлакова Е.Б., Коган А.Х., Кудрин А.Н., Николаев В.В. Явление усиления перекисного окисления липидов в ишемизированных тканях (миокарда и почки). Диплом на Открытие №393 от 13.12.1990. Бюллетень Открытий и Изобретений, №30, 3.

2. Алесенко А.В., Биленко М.В., Бурлакова Е.Б., Мольнар А.А., Учитель А.Е., Шеленкова Л.Н. (1976). Вестник АМН СССР, №8, 61-67.

3. Чуракова Т.Д., Биленко М.В., Показеева З.Т., Заславская Р.М., Полумисков В.Ю., Голиков А.П. (1985). Вестник АМН СССР, №4, 71-74.

4. Биленко М.В. (1989) Ишемические и реперфузионные повреждения органов. Медицина, Москва.

5. Bilenko M.V. (2001) Ischemia and Reperfusion of Various Organs: Injury Mechanisms, Methods of prevention and Treatment. (Boriotti S and Dennis D, eds.) Nova Science Publishers, Inc., Huntington, N.Y., USA.

6. Клебанов Г.И., Владимиров Ю.А. (1999) Успехи Современной Биологии, 119 (5), 461-474.

10 7. Ma J., Chen T., Mandelin J., Ceponis A., Miller N.E., Nikkanen M., Ma GF, Konttinen YT. (2003) Cell. Mol. Life Sci., 60, 2334-2346.

8. Takahashi K., Takeya M., Sakashita N. (2002) Med Electron Microsc., 35, 179-203.

9. Steinberg D., Parthasarathy S., Carew T., Khoo J., Witztum J. (1989) N Engl. J. Med., 320, 915-924.

15 10. Патент RU 2192643, G01N 33/92, 10.11.2002.

Формула изобретения

Способ экспресс-диагностики тяжести ишемических повреждений сердца и предрасположенности больного с ишемической болезнью сердца к прогрессированию атеросклероза, заключающийся в том, что проводят оценку степени стимуляции атерогенной функции моноцитпроизводных макрофагов из крови больных с ишемической болезнью сердца по способности макрофагов

25 а) продуцировать активные формы кислорода, оцененные по величине люминол-зависимой хемилюминесценции до 0,8-1,0 V и зимозанстимулированной хемилюминесценции до 30-50 V,

б) окислять липопroteины низкой плотности, оцененные по накоплению в них ТБК-реактивных продуктов до 0,6-0,8 нмоль МДА/мг белка,

30 в) поглощать липопroteины низкой плотности, оцененные по накоплению в макрофагах общего холестерина до 10-15 нг/10⁶ макрофагов и

г) по снижению количества жизнеспособных макрофагов в процессе 1 ч инкубации в безбелковой субстратдефицитной среде до 50-70%, и при вышеуказанных значениях по меньшей мере одного из показателей констатируют умеренную тяжесть повреждения сердца у больного с ишемической болезнью сердца и умеренную предрасположенность больного с ишемической болезнью сердца к прогрессированию атеросклероза, а при значениях, превышающих вышеуказанные по меньшей мере для одного из показателей соответственно, констатируют тяжелую форму повреждения сердца у больного с ишемической болезнью сердца и высокую предрасположенность больного с ишемической болезнью сердца к прогрессированию атеросклероза.

45

50