



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
G01N 33/53 (2019.08)

(21)(22) Заявка: 2019126987, 27.08.2019

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
27.08.2019

Дата регистрации:
17.12.2019

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 27.08.2019

(45) Опубликовано: 17.12.2019 Бюл. № 35

Адрес для переписки:

123182, Москва, ул. Щукинская, 1, ФГБУ
"НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова"
Минздрава России, отдел координации и
мониторинга научных программ

(72) Автор(ы):

Шевченко Ольга Павловна (RU),
Улыбышева Адэля Анверовна (RU),
Гичкун Ольга Евгеньевна (RU),
Стаханова Екатерина Анатольевна (RU),
Можейко Наталья Павловна (RU),
Шевченко Алексей Олегович (RU),
Готье Сергей Владимирович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
учреждение "Национальный медицинский
исследовательский центр трансплантологии
и искусственных органов имени академика
В.И. Шумакова" Министерства
здравоохранения Российской Федерации
(ФГБУ "НМИЦ ТИО им. ак. В.И.
Шумакова" Минздрава России) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: ВЕРЕВКИН А.А., и др.
Патоморфологические признаки повреждения
миокарда при отторжении
трансплантированного сердца// Кубанский
научный медицинский вестник. 2017, 24 (6), С.
17-21. RU 2480749 C1, 27.04.2013. WO
2012121594 A1, 13.09.2012. RUI DONG et al.
Galectin-3 as a novel biomarker for disease
diagnosis and a target for therapy (Review) //Int
J (см. прод.)

(54) Способ неинвазивной диагностики фиброза миокарда трансплантированного сердца в отдаленные сроки после трансплантации у реципиентов, перенесших острое отторжение

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к трансплантации органов и клинической лабораторной диагностике, и может быть использовано для диагностики фиброза миокарда трансплантированного сердца в отдаленные сроки после трансплантации у реципиента, перенесшего острое отторжение. Для этого у пациента в плазме венозной крови определяют

концентрацию галектина-3 и при его уровне выше 16,9 нг/мл диагностируют наличие фиброза трансплантата. Изобретение обеспечивает доступность и неинвазивность диагностики, сокращение времени ее проведения при одновременном достижении достоверной диагностики фиброза миокарда у указанной группы пациентов, а также повышение

выживаемости пациентов с трансплантированным сердцем и улучшение результатов трансплантации сердца за счет своевременного определения

показаний к внеплановой эндомикардиальной биопсии. 2 пр.

(56) (продолжение):

Mol Med. 2018 Feb; 41(2): 599-614.

R U 2 7 0 9 1 9 3 C 1

R U 2 7 0 9 1 9 3 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
G01N 33/53 (2019.08)

(21)(22) Application: **2019126987, 27.08.2019**

(24) Effective date for property rights:
27.08.2019

Registration date:
17.12.2019

Priority:

(22) Date of filing: **27.08.2019**

(45) Date of publication: **17.12.2019** Bull. № 35

Mail address:

123182, Moskva, ul. Shchukinskaya, 1, FGBU
"NMITS TIO im. ak. V.I. Shumakova" Minzdrava
Rossii, otdel koordinatsii i monitoringa nauchnykh
programm

(72) Inventor(s):

**Shevchenko Olga Pavlovna (RU),
Ulybysheva Adelya Anverovna (RU),
Gichkun Olga Evgenevna (RU),
Stakhanova Ekaterina Anatolevna (RU),
Mozhejko Natalya Pavlovna (RU),
Shevchenko Aleksej Olegovich (RU),
Gote Sergej Vladimirovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethnoe
uchrezhdenie "Natsionalnyj meditsinskij
issledovatel'skij tsentr transplantologii i
iskusstvennykh organov imeni akademika V.I.
Shumakova" Ministerstva zdravookhraneniya
Rossijskoj Federatsii (FGBU "NMITS TIO im.
ak. V.I. Shumakova" Minzdrava Rossii) (RU)**

(54) **METHOD FOR NON-INVASIVE DIAGNOSIS OF MYOCARDIAL FIBROSIS OF TRANSPLANTED HEART AT A LONG POST-TRANSPLANTATION PERIOD IN RECIPIENTS SUFFERING ACUTE REJECTION**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention refers to medicine, namely organ transplantation and clinical laboratory diagnostics, and can be used for diagnosis of myocardial fibrosis of transplanted heart at a long post-transplantation period in a recipient suffering acute rejection. That is ensured by diagnosing venous blood plasma concentration of galectin-3 and if its level is higher than 16.9 ng/ml, the presence of transplant fibrosis is diagnosed.

EFFECT: invention provides accessibility and non-

invasiveness of diagnostics, reduced time of its carrying out with simultaneous achievement of reliable diagnosis of myocardial fibrosis in the above group of patients, as well as increasing the survival rate of the patients with the transplanted heart and improving the results of the heart transplantation by timely determination of the indications to the unscheduled endomyocardial biopsy.

1 cl, 2 ex

C1
2709193
RU

RU
2709193
C1

Изобретение относится к медицине, а именно к трансплантации органов и клинической лабораторной диагностике, может быть использовано при ведении реципиентов сердца, перенесших острое отторжение трансплантата, для диагностики фиброза миокарда трансплантированного сердца.

5 Успешное развитие программы трансплантации сердца (ТС) содействовало решению новых задач - обеспечение длительного выживания и улучшения качества жизни пациентов с трансплантированным сердцем. Среди основных патологических факторов, ограничивающих выживаемость реципиентов сердца в раннем послеоперационном периоде и в течение первого года жизни после ТС, является острое отторжение
10 трансплантированного сердца. Реакция отторжения сердечного трансплантата является проявлением защитной реакции организма реципиента против чужеродных клеток донорского органа. Реакция отторжения включает механизмы врожденного, клеточного и антителоопосредованного (гуморального) иммунного ответа.

Патологические процессы, протекающие в трансплантированном сердце,
15 впоследствии могут приводить к разрастанию соединительной ткани - развитию фиброза миокарда. У реципиентов сердца в отдаленные сроки после трансплантации может развиваться субклиническая хроническая сердечная недостаточность, возникающая вследствие совокупности различных патологических механизмов (артериальная гипертензия, острое отторжение и васкулопатия трансплантата, а также ряд
20 сопутствующих заболеваний, в том числе наличие сахарного диабета, метаболического синдрома и прочее), приведших к формированию фиброза миокарда трансплантата.

Разработка малоинвазивных методов выявления осложнений в посттрансплантационном периоде - поиск новых биомаркеров - проводится с целью улучшения доклинической диагностики и увеличения продолжительности жизни
25 реципиентов.

В настоящее время особое внимание уделяется выявлению профиброгенных биологических агентов - биомаркеров, способных быть индикаторами риска негативных событий, связанных с развитием фиброза. Одним из новых биомаркеров развития тяжести сердечной недостаточности и фиброза миокарда является галектин-3. Галектин-3
30 относится к семейству лектинов; играет важную роль в регуляции процессов воспаления, иммунного ответа, дегенерации нервной ткани и фиброза. В месте повреждения галектин-3 секретируется во внеклеточное пространство и способствует развитию фиброза через активацию фибробластов, находящихся в покое.

Галектин-3 может иметь прогностическое значение в отношении развития
35 нежелательных событий у пациентов, страдающих сердечной недостаточностью (СН). Выявлена зависимость между уровнем галектина-3 и течением СН: повышение уровня галектина-3 указывает на развитие СН, а при снижении его концентрации - на уменьшение тяжести заболевания [Coromilas E., Que-Xu E., Moore D. et al. Dynamics and prognostic role of galectin-3 in patients with advanced heart failure, during left ventricular assist
40 device support and following heart transplantation. BMC Cardiovasc Disord. - 2016. - 16: 138-148.].

При определении динамики концентрации галектина-3 в сыворотке крови реципиентов сердца в различные сроки после трансплантации выявлена обратная корреляция между уровнем галектина-3 и скоростью клубочковой фильтрации. Однако не выявлено связи
45 между уровнем галектина-3, наличием гипертрофии и фиброза миокарда трансплантата. Результаты проводимых исследований позволяют предположить, что галектин-3 может играть роль системного биомаркера, но не кардиоспецифического [Circulating galectin-3 levels are persistently elevated after heart transplantation and are associated with renal dysfunction

/ Grupper A., Nativi-Nativi J., Maleszewski J.J. et al. // JACC: Heart Failure. - 2016. - 4: 847-856].

На сегодняшний день объективным методом верификации степени и характера острого отторжения трансплантированного сердца, васкулопатии и фиброза миокарда трансплантата является эндомиокардиальная биопсия (ЭМБ) и коронарографическое исследование [Веревкин А.А., Славинский А.А., Космачева Е.Д. и др. // Кубанский научный медицинский вестник. - 2017. -24 (6). - С. 17-21] - (прототип). ЭМБ выполняются в сроки после трансплантации, предусмотренные протоколом, а также при проявлении признаков нарушения функции трансплантированного сердца.

Однако ЭМБ имеет ряд ограничений и рисков, свойственных инвазивным методам диагностики. Кроме того, при получении биоптата исследуют локальный участок, который не всегда может отражать состояние целого трансплантированного органа [Ставенчук Т.А., Космачева Д.В., Шелестова Е.Д. и др. Оценка предикторов отторжения миокарда у пациентов после ортотопической трансплантации сердца с помощью трансторакальной эхокардиографии и методики speckle tracking echocardiography // Креативная кардиология. - 2015. - №3. - С. 56-66]. Многочисленные публикации зарубежных и отечественных авторов свидетельствуют о высоком риске осложнений и неблагоприятного исхода при использовании данного метода. В связи с его трудоемкостью существует очевидная необходимость в разработке нового неинвазивного диагностического средства, которое может не только выявить наличие фиброза миокарда трансплантата, но и контролировать лечение реципиента.

Нами поставлена задача - разработать доступный, достоверный способ неинвазивной диагностики фиброза миокарда трансплантированного сердца у реципиентов, перенесших острое отторжение трансплантата.

Технический результат, достигаемый при осуществлении изобретения, заключается в обеспечении неинвазивности, снижении трудоемкости, времени проведения, повышении доступности диагностики фиброза миокарда трансплантированного сердца в отдаленные сроки после трансплантации у реципиентов, перенесших острое отторжение трансплантата, при одновременном достижении достоверной диагностики фиброза у данного контингента пациентов, а также повышении ее объективности за счет возможности вынесения суждения с учетом показателя, отражающего состояние всего сердца.

Предлагаемый способ позволяет повысить выживаемость пациентов с трансплантированным сердцем и улучшить результаты трансплантации сердца за счет своевременного определения показаний к внеплановой эндомиокардиальной биопсии путем определения уровня концентрации галектина-3 в плазме крови.

Нами эмпирически установлен достоверный диагностический показатель развития фиброза миокарда трансплантированного сердца в отдаленные сроки после трансплантации, основанный на оценке концентрации галектина-3 в плазме венозной крови реципиентов сердца, перенесших эпизоды острого отторжения трансплантата.

Использование предполагаемого маркера позволяет ограничить круг пациентов, которым требуется проведение эндомиокардиальной биопсии для уточнения диагноза фиброза миокарда трансплантированного сердца.

Сущность изобретения состоит в следующем.

Для диагностики фиброза миокарда трансплантированного сердца в отдаленные сроки после трансплантации у реципиента, перенесшего острое отторжение, в плазме венозной крови определяют концентрацию галектина-3. При его уровне выше 16,9 нг/мл диагностируют наличие фиброза трансплантата.

Способ осуществляется следующим образом.

В качестве материала для исследования концентрации биомаркера используется плазма венозной крови. Взятие крови для исследования производят, как правило, одновременно с плановым обследованием пациентов.

5 Кровь собирают в одноразовые пробирки с антикоагулянтом ЭДТА (BD Vacutainer, Becton Dickinson, США) и центрифугируют в течение 10 минут при 3500/1500 g оборотах при комнатной температуре. Полученную плазму замораживают и хранят при температуре -20°C.

10 Концентрация галектина-3 может быть измерена иммуноферментным методом, например с помощью наборов реагентов Human Galectin-3 Platinum ELISA (Bender MedSystems GmbH, Vienna, Austria).

Определение проводят в соответствии с инструкцией к наборам.

В подготовленные для работы планшеты с фиксированными на дне лунок моноклональными антителами к галектину-3, добавляют заранее подготовленные
15 калибраторы, контроли и разведенные в 2 раза специальным буфером образцы плазмы венозной крови пациентов. Инкубируют микропланшет при комнатной температуре (18-25°C) в течение 60 минут при встряхивании со скоростью 400 оборотов в минуту. После четырехкратного отмывания планшета от несвязавшихся компонентов реакции в каждую лунку вносят по 100 мкл рабочего раствора конъюгата (стрептавидин-HRP).
20 Инкубируют планшет при комнатной температуре (18-25°C) в течение 60 минут при встряхивании со скоростью 400 оборотов в минуту.

После последнего этапа отмывания на заключительном этапе для выявления ферментной метки в планшет вносят по 100 мкл ТМБ-субстрата. Время инкубации составляет 30 минут в темноте. Реакцию останавливают с помощью стоп-реагента (по
25 100 мкл в лунку). Интенсивность изменения цвета реагентной смеси прямо коррелирует с концентрацией галектина-3 в исследуемом образце. Оптическую плотность при длине волны 450 нм измеряют на спектрофотометре.

У реципиентов сердца, перенесших острое отторжение трансплантата, с уровнем галектина-3 в отдаленные сроки выше 16,9 нг/мл определяют наличие фиброза.

30 Для доказательств возможности реализации заявленного назначения и достижения указанного технического результата приводим следующие данные.

Пример 1.

Пациенту И., 49 лет, выполнена ортопическая трансплантация сердца.

Послеоперационный период протекал гладко. В течение периода наблюдения (с первых
35 суток и до 2 лет после трансплантации) у пациента по результатам ЭМБ диагностировано 4 эпизода острого отторжения сердечного трансплантата. Иммуносупрессивная терапия назначена по стандартной схеме лечения острого отторжения трансплантата. Измеренный на 947 сутки после операции уровень галектина-3 в плазме венозной крови составил 36,15 нг/мл. В соответствии с
40 предлагаемым способом у пациента, перенесшего кризы острого отторжения диагностирован фиброз миокарда трансплантата. Методом эндомикардиальной биопсии диагноз подтвержден: был установлен диффузный фиброз миокарда.

Пример 2.

Пациенту А., 32 лет, выполнена ортопическая трансплантация сердца.

45 Послеоперационный период протекал гладко. В течение периода наблюдения (с первых суток и до 2 лет после трансплантации) у пациента по результатам ЭМБ диагностировано 4 эпизода острого отторжения сердечного трансплантата. Иммуносупрессивная терапия назначена по стандартной схеме лечения острого

отторжения трансплантата. Измеренный на 772 сутки после операции уровень галектина-3 в плазме крови составил 13,00 нг/мл. По данным ЭМБ признаков фиброза миокарда трансплантата не обнаружено.

Предложенный способ апробирован в клинической практике на 82 реципиентах в отдаленные сроки после трансплантации сердца, перенесших острое отторжение трансплантата. Уровень галектина-3 в отдаленные сроки после трансплантации выше установленного нами порогового значения - 16,9 нг/мл был у 49 реципиентов сердца, из них у 44 (89,8%) развился фиброз миокарда трансплантата, что подтверждено результатами ЭМБ. Уровень галектина-3 был ниже порогового значения у 33 реципиентов сердца, фиброз миокарда развился у 18 пациентов. Таким образом, чувствительность предлагаемого способа диагностики составила 71%, его специфичность - 75%.

Использование в клинической практике патентуемого способа дает возможность диагностировать наличие фиброза миокарда трансплантата в отдаленные сроки после трансплантации у реципиентов, перенесших острое отторжение трансплантата.

(57) Формула изобретения

Способ диагностики фиброза миокарда трансплантированного сердца в отдаленные сроки после трансплантации у реципиента, перенесшего острое отторжение, отличающийся тем, что в плазме венозной крови определяют концентрацию галектина-3 и при его уровне выше 16,9 нг/мл диагностируют наличие фиброза трансплантата.

25

30

35

40

45