



УКРАЇНА

(19) UA (11) 13174 (13) U
(51) МПК
G01N 33/538 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ ЕФЕКТИВНОСТІ ЛІКУВАННЯ ХВОРИХ НА ТУБЕРКУЛЬОЗ ЛЕГЕНЬ

1

2

(21) u200509304

(22) 03.10.2005

(24) 15.03.2006

(46) 15.03.2006, Бюл. № 3, 2006 р.

(72) Мясніков Віктор Георгійович, Ігрунова Ксенія Миколаївна, Вишнякова Ольга Борисівна, Баранніков Руслан Олексійович, Супрунець Олег Петрович

(73) КИЇВСЬКА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ ПІСЛЯДИПЛОМНОЇ ОСВІТИ ІМ. П.Л.ШУПИКА

(57) Спосіб оцінки ефективності лікування хворих на туберкульоз легень шляхом визначення апоптотичних клітин, який **відрізняється** тим, що визначають індекс індукції апоптозу, а саме - відношення апоптотичних індексів спонтанного та індукованого апоптозу і при зменшенні індексу індукції апоптозу після проведеного лікування визначають позитивний ефект лікування, а при незміненому та при збільшенні індексу індукції апоптозу - констатують недостатню ефективність лікування.

Корисна модель відноситься до галузі медицини, а саме до галузі фтизіатрії та імунології і може бути використана для оцінки ефективності лікування туберкульозу шляхом визначення апоптотичних клітин.

Відомий являється взятий нами за найближчий аналог спосіб контролю ефективності використання ліків та застосовуваного лікування шляхом вимірювання апоптотичних клітин ["Спосіб визначення та/або кількісного виявлення та/або відділення апоптотичних клітин у зразку або частині зразка", патент на винахід WO 9527903 A1, від 19.10.95, Изобретения стран мира (1996). - Выпуск 084, №17. - С.48]. Спосіб полягає у визначенні апоптозу для підтвердження клінічного діагнозу і контролю ефективності використання ліків та застосовуваного лікування. Спосіб передбачає контакт зразка з визначаючим реагентом, який має сильну спорідненість до фосфатиділсерину плазматичної мембрани апоптотичних клітин, якісне і можливе кількісне визначення клітин, переважно інтактних, що реагують з застосовуваним реактивом, і відділення апоптотичних клітин від неапоптотичних, які не реагують з ним.

Недоліком використання абсолютних величин апоптозу для оцінки ефективності лікування є залежність величини апоптозу від часу, що пройшов від моменту забору клітин до початку дослідження та функціонального стану організму перед забором крові. Також величини спонтанного, індукованого апоптозу та індукція апоптозу характеризують

кожна окрему ланку патогенезу.

Задачею способу, що заявляється є об'єктивізація методу дослідження для усунення впливу факторів зовнішнього та внутрішнього середовища.

Вирішення поставленої задачі досягається тим, що у відомому способі - "Спосіб оцінки ефективності лікування хворих на туберкульоз легень" шляхом визначення апоптотичних клітин, згідно з запропонованим рішенням визначають індекс індукції апоптозу, а саме відношення апоптотичних індексів спонтанного та індукованого апоптозу і при зменшенні індексу індукції апоптозу після проведеного лікування визначають позитивний ефект лікування, а при незміненому та при збільшенні індексу індукції апоптозу - констатують недостатню ефективність лікування.

Спосіб, що заявляється виконують наступним чином. З гепаринізованої крові виділяють мононуклеарні клітини за допомогою центрифугування з прискоренням 400g протягом 25-35 хвилин у градієнті щільності фікол-верографіну ($\rho=1,077-1,078$), знімають кільце мононуклеарів. Отримані клітини піпетують та двічі центрифугують по 8-12 хвилин з прискоренням 200g у розчині нейтрального буфера, наприклад phosphate buffer solution з pH 7,2-7,4. З відмитих клітин в концентрації $5-6 \times 10^6$ клітин/мл готують подвійні культури, які поміщають у живильне середовище, що містить 10% ембріональної телячої сироватки, у співвідношенні 1:1. До однієї з подвійних культур додають розчин

UA (11) 13174 (13) U

індуктора апоптозу, наприклад, дексаметазону в кінцевій концентрації 10^{-5} – 10^{-7} М. Культури клітин інкубують протягом 12-72 годин при температурі 37°C.

Після інкубації клітини піпетують у розчині нейтрального буфера, наприклад phosphate buffer solution з pH 7,2-7,4, центрифугують. 3-7 хвилин з прискоренням 400g. Підраховують відсоткове співвідношення живих та мертвих клітин за допомогою стандартного теста з постмортальним барвником, наприклад, трипановим синім. Відмиті клітини інкубують 25-35хв. при температурі 37°C з розчином барвника, наприклад, Hoechst 33342 у концентрації 0,05-0,15мкг/мл у співвідношенні суспензії клітин/розчин барвника - 1:1-2:1, центрифугують з додаванням розчину нейтрального буфера, наприклад phosphate buffer solution з pH 7,2-7,4, центрифугують 3-7 хвилин з прискоренням 400g. Клітини фіксують фіксуючою сумішшю, поміщають на предметне скельце, покривають покривним скельцем та запаюють. Препарати переглядають при освітленні люмінесцентною лампою при збільшенні 7х90. Визначають апоптотичний індекс як відсоткове співвідношення кількості клітин з ознаками апоптозу на 2000 клітин, виявлених у полях зору мікроскопу. Апоптотичний індекс визначають як в клітинах, які інкубувались тільки у живильному середовищі - індекс спонтанного апоптозу, так і в клітинах, які інкубувались в живильному середовищі в присутності дексаметазону - індекс індукованого апоптозу. Індекс індукції апоптозу визначається як співвідношення індексів спонтанного та індукованого апоптозу у даного хворого. І при зменшенні індексу індукції апоптозу після проведеного лікування визначають позитивний ефект лікування, а при незміненому або при збільшенні індексу індукції апоптозу констатують недостатню ефективність лікування.

Приклад 1

Хворий К-нко О.Т., історія хвороби №1304. Діагноз : дисемінований туберкульоз легень в фазі інфільтрації та розпаду, МБТ(+). Рентгенологічна картина 04.06.2002 р. при поступленні до початку лікування: білатерально більше в верхніх та середніх легеневицях полях різноманітні вогнища інфільтрації з ділянками просвітлення, справа, в верхній долі CV 5х4см в S₆ CV діаметром 4см: Індекс індукції апоптозу 11.06.2002 - 1,4285. Рентгенологічна

картина при контрольному обстеженні після лікування: подальше розсмоктування вогнищево-інфільтративних змін в легенях, зменшення розмірів порожнин деструкції. Індекс індукції апоптозу 07.11.2002 р. - 0,6341.

Приклад 2.

Хворий П-в Б.М., історія хвороби №1291/1335. Діагноз інфільтративний туберкульоз верхньої частки лівої легені в фазі розпаду та засіювання, МБТ(+). Рентгенологічна картина 07.06.2002 р. при поступленні до лікування: зліва в верхній долі каверна діаметром 4см з перикавітарною інфільтрацією, множинні середніх та крупних розмірів вогнища. Індекс індукції апоптозу 18.06.2002 р. - 1,8125. Рентгенологічна картина при контрольному обстеженні після лікування: зменшується кількість вогнищ та перикавітарної інфільтрації, зменшуються розміри порожнин. Індекс індукції апоптозу 05.11.2002 р. - 0,6545.

Приклад 3

Хвора М-ва К.Д., історія хвороби №1223. Діагноз : Дисемінований туберкульоз легень в фазі інфільтрації та засіву, МБТ(+), інфільтративно-виразковий туберкульоз головного та верхньодольового бронхів правої легені. Рентгенологічна картина 24.05.2002 р. при поступленні до лікування: на фоні посиленого деформованого легеневого малюнку - дрібновогнищеві тіні, в нижніх відділах - зливного характеру. Індекс індукції апоптозу 30.05.2002 р. - 0,5909. Рентгенологічна картина при контрольному обстеженні після лікування: білатерально в верхніх відділах продовжується розсмоктування вогнищево-інфільтративних змін, легеневицями малюнок посилений. Індекс індукції апоптозу 21.11.2002 р. - 0,5424.

Таким чином, використання методу, що заявляється в ЦНДЛ та на кафедрі фтизіатрії КМАПО ім. П.Л. Шулика та в роботі відділень науководослідного інституту фтизіатрії та пульмонології ім. Ф.Г. Яновського дозволило оцінити ефективність лікування вперше виявленого туберкульозу легень. Крім того, метод, що заявляється дозволив об'єктивізувати оцінку результатів дослідження апоптичного індексу за рахунок культивування клітин та використання для оцінки ефективності лікування індексу індукції апоптозу.