

**УКРАЇНА****(19) UA****(11) 111344****(13) C2****(51) МПК****A61B 10/02** (2006.01)**G01N 33/483** (2006.01)**C12N 5/071** (2010.01)

**ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ**

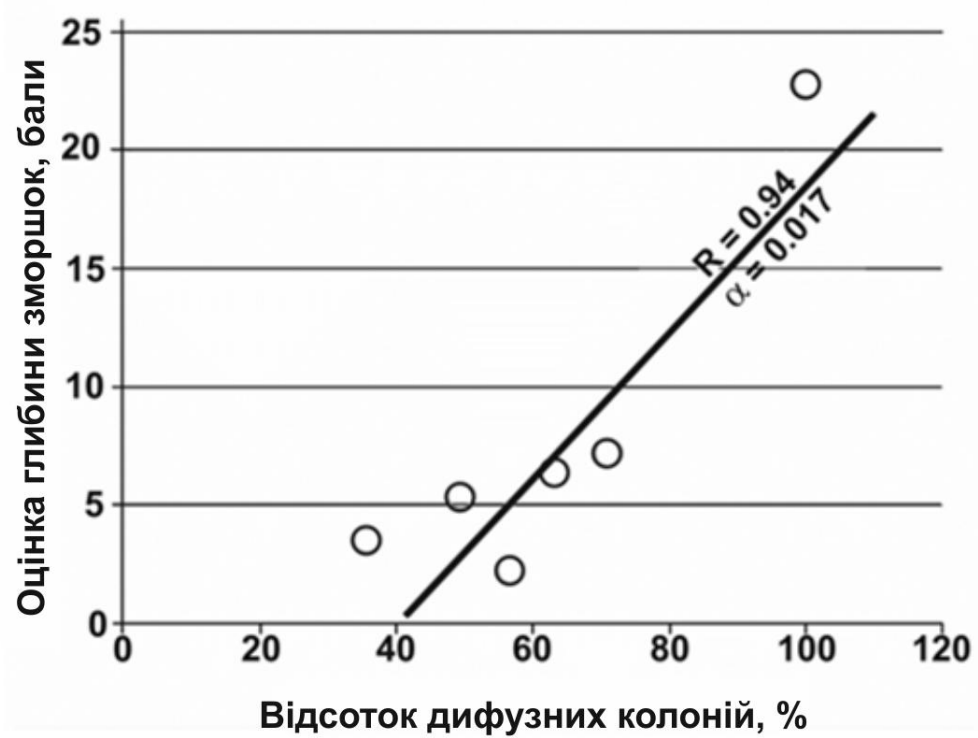
(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: а 2013 08129	(72) Винахідник(и): Зорін Вадім Леонідовіч (RU), Зоріна Алла Івановна (RU), Черкасов Владімір Рюриковіч (RU), Копнін Павел Борисовіч (RU)
(22) Дата подання заявки: 06.09.2012	(73) Власник(и): ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "ВИТАЦЕЛ", М. Сухаревский пер., д. 9, стр. 1, г. Москва, 127051, Российская Федерация (RU)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 25.04.2016	(74) Представник: Піскова Олена Віллівна, реєстр. №289
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 2011140055	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: А.Ю. Беляева. НАРУШЕНИЯ ПРОЛИФЕРАТИВНОГО ПОТЕНЦИАЛА ФИБРОБЛАСТОВ ДЕРМЫ ПРИ СТАРЕНИИ КОЖИ. Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск, 22.09.2009 WO 2005/078073 A2, 25.08.2005
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 03.10.2011	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: RU	
(41) Публікація відомостей про заявку: 10.06.2014, Бюл.№ 11	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.04.2016, Бюл.№ 8	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/RU2012/000745, 06.09.2012	

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ СПОЛУЧНОЇ ТКАНИНИ ТА ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ**(57) Реферат:**

Винахід належить до медицини і може бути використаний для оцінки стану дерми пацієнтів. Спосіб включає отримання колоній фібробластів шкіри в умовах, що забезпечують формування дискретних колоній, придатних для візуалізації та визначення параметра ефективності колонієутворення фібробластів як такого, що характеризує регенераторний потенціал популяції фібробластів, визначення процентних часток щільних та дифузних колоній в культурі фібробластів як параметра, що характеризує проліферативний потенціал клітин або визначення показника проліферації як процентної частки щільних, дифузних та змішаних колоній в культурі клітин як параметра, що характеризує проліферативний потенціал фібробластів, та обробку отриманих результатів.

UA 111344 C2



Фіг. 3

Область застосування

Винахід відноситься до медицини і може бути використаний для оцінки стану або виявлення патології сполучної тканини (і / або органу) шляхом проведення клонального аналізу субстрат-залежних клітин, що входять до складу даної тканини. Зокрема винахід відноситься до естетичної медицини та може застосовуватися для оцінки стану дерми і подальшої індивідуальної корекції вікових та інших структурних змін шкіри. Пропонований спосіб оцінки клітинної популяції (зокрема, популяції фібробластів), що входять до складу сполучних тканин може бути використаний для вивчення стану, патології або яких-небудь змін, детермінованих, опосередкованих або іншим чином пов'язаних з особливостями процесів регенерації, що відбуваються в даних тканинах (і / або органах). Так само спосіб може застосовуватись для прогнозування ефективності лікування, корекції змін і патології, результат яких залежить від регенераційних процесів, їх швидкості і тривалості.

Попередній рівень техніки

Відомий спосіб аналізу процесу старіння клітин шляхом ідентифікації змін біологічних параметрів клітин, наприклад, характеристик клітинного метаболізму під дією факторів старіння [патент GB2395489, МПК C12N5/06]. Цей спосіб включає протеомні, геномні або транскриптомні дослідження або їх комбінації з подальшим порівнянням отриманих результатів таких досліджень для клітин, тобто взятих у молодого донора з малим числом пасажів культивування *in vitro*, або клітин, отриманих з тканини з мінімальною експозицією УФ-опроміненню, і клітин, отриманих від літніх донорів або клітин з великим числом пасажів *in vitro* або клітин з тканини, що зазнала високого ступеню впливу УФ-опромінення і клітинних культур, поміщених в тривимірний матрикс, що імітують біологічну тканину (сполучну, епітеліальну, епідермальну і т.д.). Цей спосіб пропонується використовувати для скринінгових досліджень з пошуку лікарських засобів, здатних модулювати метаболічні процеси в старіючих клітинах.

До недоліків даного способу відноситься складність його виконання, що вимагає високої кваліфікації персоналу і наявність спеціального дорогого обладнання, що ускладнює рутинне застосування методу, особливо в практиці лікарів-косметологів. Крім того, даний винахід обмежується дослідженням клітин тільки *in vitro* і не може бути використаний для характеристики стану клітинної популяції *in vivo*, тобто тканини, з якої дані клітини були виділені і, отже, не може бути використаний для діагностики цієї тканини на клітинному рівні і прогнозу подальшої терапії.

Відомий спосіб визначення колонієутворювальних одиниць (КУО) ендотеліальних прогеніторних клітин шляхом характеристики клітинного препарату для застосування в регенеративній медицині або клінічній трансплантології [заявка WO 2008110570, МПК G01N33/50, C12N5/06]. У заявці описаний метод аналізу ступеню впливу речовин та умов проведення аналізу на величину КУО ендотеліальних прогеніторних клітин для його подальшого використання в якості скринінгового тесту на виявлення позитивного або негативного впливу окремих речовин на проліферацію ендотеліальних прогеніторних клітин. Цей спосіб включає експлантацію вихідних клітин в підходящому середовищі з щільністю, що виключає контактне інгібування росту клітин, подальше інкубування клітин протягом декількох днів і проведення аналізу колоній, що утворилися. Аналіз колоній проводили шляхом їх фарбування, підрахунку та ранжування за розміром на дві групи - колонії клітин з високим проліферативним потенціалом (колонії більше певного порогового значення, рівного, залежно від складу середовища, 2 або 4 мм) і колонії з низьким проліферативним потенціалами (рівним або менше порогового значення).

Недоліком даного способу є те, що спосіб обмежується лише аналізом ендотеліальних прогеніторних клітин (ендотеліальних клітин пупкового канатику людини (HUVEC); ендотеліальних клітин мікросудин людини). Так само цей винахід обмежується дослідженням тільки клітин *in vitro* і не може бути використано для характеристики стану клітинної популяції тканини *in vivo*, з якої дані клітини були виділені і, отже, не може бути використаний для оцінки стану тканини на клітинному рівні і прогнозу подальшої терапії.

Відомий спосіб аналізу популяції фібробластів з шкірно-м'язової тканини 7-8-тижневих ембріонів людини [патент RU 2017818, МПК C12N5/02], що включає трипсинізацію клітин, їх експлантацію і інкубацію в живильному середовищі з наступним підрахунком веретеноподібних, парусоподібних і плеоморфних клітин.

За допомогою даного способу досліджують постнатальні культури дермальних фібробластів на предмет мітотичної активності клітин шляхом підрахунку колоній з певною кількістю і щільністю клітин.

До недоліків способу слід віднести його трудомісткість, потребу у використанні спеціального інструментального забезпечення, суб'єктивний і якісний характер одержуваних результатів, що утруднює їх інтерпретацію і обмежує їх практичне застосування.

Спосіб прогнозування перебігу дистракційного остеогенезу запропонований в патенті RU 2110798 МПК G01N33/48. Спосіб полягає в тому, що клітини кісткового мозку, наприклад груднини, експериментальної тварини або людини культивують у дифузійних камерах, які імплантують мишам внутрішньочеревинно. Через 7 діб камери витягують і з їх вмісту готують цитологічні препарати, в яких підраховують число кластерів і колоній моноцитарно-макрофагального і фібробластного типів, і по їх співвідношенню розраховують прогностичний індекс (ПІ) і при $ПІ > 1$ прогнозують порушення процесів кісткоутворення. Автори заявляють, що даний спосіб є малотравматичним і дозволяє в ранні терміни більш точно виявляти порушення кісткоутворення, пов'язані з розладом імунологічної регуляції дистракційного остеогенезу.

До недоліків даного способу слід віднести його вузькоспеціалізовану спрямованість (прогнозування перебігу дистракційного остеогенезу за оцінкою числа клоногенних клітин кісткового мозку), що обмежує можливість застосування методу для вивчення регенеративних процесів в інших тканинах і органах. Крім того, метод передбачає активне використання великої кількості лабораторних тварин (до 6 мишей на одне дослідження), що несе за собою, поряд з етичними проблемами, необхідність утримання спеціалізованого віварію і наявність кваліфікованого обслуговуючого персоналу, що значно здорожує і ускладнює застосування запропонованого способу.

Відомий також спосіб прогнозування результату оперативного лікування хронічного остеомієліту [SU 1372216, МПК G01N1/28], що включає забір матеріалу, отримання клітин та їх культивування з наступним визначенням кількості колоній фібробластів кісткового мозку, що вирости, в якому, для підвищення точності способу, матеріал після забору з остеомієлітичного вогнища поміщають на 12-24 години в середовище 199 з антибіотиками, а підрахунок ефективності клонування стромальних клітин кісткового мозку роблять за формулою: $ЕКФ = a * 100000 / n$, де: ЕКФ = ефективність клонування, а - кількість колоній, що вирости; n - кількість кістково-мозкових клітин, і при значеннях ЕКФ не більше 5 прогнозують несприятливий результат післяопераційного періоду, а при значеннях 5.1-100000 - сприятливий результат.

Як впливає з опису, даний винахід передбачає діагностичне використання тільки одного параметра - ефективності клонування клітин, виділених безпосередньо з кісткової тканини пацієнта. Зокрема, на відміну від методу, запропонованого в даному винаході, даний метод передбачає розгляд тільки добре помітних колоній, не беручи до уваги їх розподіл по щільності клітин і наявність не видимих неозброєним оком дифузних колоній, що може містити цінну діагностичну інформацію. Описаний вище параметр ефективності клонування в рівній мірі залежить від двох показників, що доповнюють один одного: кількості клітин, здатних при їх подальшому культивуванні утворювати колонії (так званих колонієутворювальних одиниць фібробластів, КУОф) і від проліферативної активності цих КУОф (тобто швидкості утворення колоній). Підрахунок же тільки одних добре сформованих колоній може призвести до заниження результатів і, в кінцевому рахунку, до спотворення істинної картини. Крім того, наявні експериментальні дані свідчать про сезонні коливання проліферативної активності клітин кісткового мозку, що негативно позначається на відтворюваності результатів і змушує авторів патенту використовувати додаткові заходи для забезпечення високої проліферативної активності клітин, зокрема, застосування фідера на основі клітин тварин, що зменшує технологічність і підвищує собівартість методу.

Короткий опис малюнків

Фіг. 1. Принципова схема комп'ютерної системи.

Фіг. 2. Електронне зображення типових колоній пацієнта (А) та результат їх комп'ютерної обробки для проведення морфометричного аналізу (Б).

На Фіг. 3-5 представлені результати клонального аналізу. Графіки статистично-значимих залежностей, виявлених за допомогою кореляційного аналізу Пірсона, де R – коефіцієнт кореляції Пірсона (чим ближче до одиниці, тим сильніша залежність параметрів, що досліджуються) при рівні статистичної значимості α .

Фіг. 3 Залежність частки дифузних колоній від інструментальної оцінки глибини зморщок (Visia, Proctor&Gamble Co, США).

Фіг. 4 Залежність частки щільних колоній від еластичності шкіри пацієнта (Cutometer MPA 580, Courage+Khazaka electronic GmbH, Німеччина).

Фіг. 5 Залежність частки дифузних колоній від еластичності шкіри пацієнта (Cutometer MPA 580, Courage+Khazaka electronic GmbH, Німеччина).

Фіг. 6 Електронне зображення колоній (А) і результат їх комп'ютерної обробки для

проведення морфометричного аналізу (Б) (пацієнтка К, 56 років).

Фіг. 7 Електронне зображення колоній (А) і результат їх комп'ютерної обробки для проведення морфометричного аналізу (Б) (пацієнтка Д, 36 років).

Фіг. 8 Схема взаємодії основних функціональних блоків комп'ютерної системи.

5 Фіг. 9 Алгоритм роботи програмного забезпечення.

Розкриття винаходу

В основі розробленого способу оцінки стану і / або виявлення патології сполучної тканини пацієнта лежить визначення регенераторного і проліферативного потенціалів клітин, що входять до складу даної тканини - фібробластів, що дає можливість оцінити регенераторний потенціал і самої сполучної тканини. Відомо, що темп оновлення сполучної тканини в дорослому організмі здійснюється завдяки функціонуванню стромбурових / прогеніторних (попередників) стромальних клітин, що дають потомство клітин, що диференціюються / диференційованих. За вмістом таких попередників стромальних клітин в сполучній тканині і оцінюють її регенераторний потенціал - здатність клітинної популяції даної тканини до відновлення її структурних компонентів замість втрачених (в результаті старіння і / або ушкоджень різного генезу). Т.ч. регенераторний потенціал може бути інтерпретований як параметр, що характеризує принципову здатність клітинної популяції до відновлення тканини. Однак цей параметр не охоплює такий показник, як швидкість регенеративних процесів.

У цьому зв'язку другим важливим параметром для спільної характеристики ефективності регенеративних процесів в сполучних тканинах організму є проліферативний потенціал - кількість поділів, які клітини можуть пройти до своєї загибелі, тобто, іншими словами, це здатність клітин до багаторазового поділу для збереження функціонально-активної клітинної популяції в тканині. Очевидно, чим вище проліферативний потенціал клітин, що складають дану тканину або орган, тим більше в них мітотично активних клітин і, отже, тим швидше будуть здійснюватися регенеративні процеси.

Таким чином, обидва описаних вище параметри - регенераторний потенціал (наявність і кількість "активних центрів" регенерації) і проліферативний потенціал (кінетичні особливості регенеративних процесів) - доповнюючи один одного, характеризують ефективність процесів регенерації тканини (здатність тканини до відновлення). У цьому зв'язку процес зниження або втрати функцій того чи іншого органу / тканини може бути розглянутий з позиції порушення в них нормального перебігу регенеративних і, у свою чергу, зведений до зниження їх регенераторного і / або проліферативного потенціалів, а саме завдання по виявленню таких порушень зводиться до визначенню та інтерпретації цих параметрів.

Реалізація даного винаходу дозволяє розширити арсенал сучасних методів оцінки стану сполучних тканин (і / або органів), виявлення в них порушень шляхом впровадження в широку клінічну практику простого, доступного і достовірного методу, заснованого на клональному аналізі субстрат-залежних клітин, що входять до складу даних тканин.

Завданням, яке вирішується в рамках даного винаходу, є створення універсального способу діагностики тканин і органів живого організму на підставі аналізу популяції складових їх клітин (мезенхімних стромальних клітин, фібробластів). Отримані в результаті такого дослідження показники регенераторного і проліферативного потенціалів можуть бути використані з діагностичною та / або прогностичною метою в дерматології (наприклад, для оцінки стану дерми при її вікових змінах), стоматології (наприклад, при пародонтозі) при захворюваннях опорно-рухового апарату (наприклад, при хронічному остеомієліті, некрозі голівки стегна та ін.)

Так, при використанні даного винаходу для оцінки стану шкіри пацієнта, дані показники дозволяють зробити висновки про морфофункціональний стан популяції дермальних фібробластів і скласти індивідуальну програму корекції існуючих змін шкіри пацієнта та профілактики її старіння. Така програма може включати рекомендації по кількості процедур клітинної терапії (зокрема, інтрадермального введення культивованих аутологічних фібробластів), термінів їх проведення, а також - використанню косметологічних методів з урахуванням ступеню їх впливу на всі шари шкіри з метою досягнення стійкого естетичного результату без шкоди для популяції фібробластів.

В основі теоретичного обґрунтування даного винаходу лежить добре відомий факт про те, що стромальні клітини-попередники, будучи субстрат-залежними клітинами, при культивуванні *in vitro* утворюють дискретні колонії, кожна з яких представляє собою потомство однієї клітини (клон). Таким чином, шляхом проведення клонального аналізу і визначення, наприклад, ефективності колонієутворення (ЕКЗ), яке представляє собою відношення числа колоній фібробластів, що вирости до кількості експлантованих (посіяних) клітин - можливе визначення вмісту клітин-попередників у зразку даної тканини або органу. ЕКЗ є величиною, яка відображає в клітинній культурі частку колонієутворювальних (клоногенних) субстрат-залежних клітин і, при

відповідному перерахунку на масу біоптату - вміст прогеніторних клітин в тканині. Чим більша величина ефективності колонієутворення, тим більше в тканині клітин-попередників фібробластів, тим, відповідно, більше диференційованих (зрілих) функціонально-активних фібробластів, і, отже, вище регенераторний потенціал тканини і, навпаки.

У результаті проведених досліджень нами виявлено, що при дотриманні спеціальних умов, результат формування колоній є високо відтворюваним (в межах 5-7 % помилки) як за кількістю колоній, що утворилися, так і за їх формою та морфологічними особливостями, для всіх клітин даної тканини або органу, що має подібні функції і місце розташування. Це дозволяє екстраполювати дані, отримані для колоній і складових їх клітин, на всю клітинну популяцію тканини, тканину і / або орган з метою оцінки їх стану та розробки рекомендацій для корекції у разі виявлення порушень.

Таким чином, дослідження ЕКО-ф є найбільш інформативним і точним методом визначення регенераторного потенціалу популяції мезенхімальних стромальних клітин і, відповідно, досліджуваної тканини.

Спосіб діагностики стану тканини і / або органу передбачає проведення 2-х етапів дослідження:

1. Етап попередніх досліджень. На даному етапі проводять визначення параметрів сполучної тканини донора, які визначають регенераторний і проліферативний потенціали субстрат-залежних клітин в нормі, що входять до її складу. При цьому визначення зазначених параметрів проводять в суворо контрольованих умовах на великій вибірці донорів із заздалегідь відомими результатами обстеження, що підтверджують відсутність у них патології. У результаті проведених досліджень отримують інтервал середніх значень параметрів, що визначають регенераторний і проліферативний потенціали субстрат-залежних клітин, які входять до їх складу, що відповідають нормальному стану даної тканини.

2. Етап діагностики. На даному етапі проводять визначення тих же параметрів тканини, що характеризують регенераторний і проліферативний потенціали клітин, які входять до її складу, що і на етапі попереднього дослідження, але вже у пацієнта, стан тканини (і / або органу) якого необхідно встановити. Після отримання значень зазначених параметрів їх порівнюють з певним раніше інтервалом середніх значень і роблять висновок про наявність чи відсутність патології.

Слід зазначити, що етап попередніх досліджень не завжди є обов'язковим, оскільки діапазон середніх значень параметрів може бути відомий з літературних даних чи інших надійних джерел. У деяких випадках математична обробка результатів може не проводитися.

Етап діагностики включає:

I. Отримання придатних для візуалізації колоній субстрат-залежних клітин аналізованої тканини (і / або органу). Для цього проводять:

1. Відбір зразка тканини пацієнта;

2. Виділення життєздатних субстрат-залежних клітин зі зразка тканини в стандартних умовах;

3. Експлантація виділених клітин з щільністю, що дозволяє отримати колонії для статистично достовірного аналізу, на поверхню культурального пластика з використанням класичних методів культивування клітин;

4. Культивування клітин в стандартних умовах протягом контрольованого часу, достатнього для утворення сформованих дискретних клітинних колоній, придатних для візуалізації.

II. Проведення статистично достовірного аналізу отриманих колоній.

При цьому проводять:

1. Візуалізацію утворених колоній з використанням стандартних засобів і протоколів;

2. Аналіз зображень колоній з метою отримання ряду параметрів, що характеризують ріст і морфологічні особливості клітинних культур, по яких згодом визначають їх проліферативний і регенераторний потенціали.

III. Обробка отриманих результатів.

Докладний опис кожного з етапів:

I. Отримання колоній субстрат-залежних клітин.

1. Забір зразку тканини (біоптату).

Забір біоптату виконують в асептичних умовах із сполучної тканини органу, дослідження якого проводять в рамках даного Винаходу. Розташування та спосіб забору біоптату повинні бути суворо стандартизовані в межах однієї групи аналізів. Вибір ділянки біопсії тканини здійснюють виходячи з міркування забезпечення репрезентативної вибірки клітинного матеріалу, який максимально відображає стан тканини (органу), що цікавить та не пошкоджений факторами зовнішнього середовища.

2. Виділення життєздатних субстрат-залежних клітин.

Виділення життєздатних клітин з біоптату тканини донора проводять в стерильних умовах по стандартних протоколах за допомогою протеолітичних ферментів - колагенази або лібераз. Метою даного етапу є вивільнення життєздатних клітин з міжклітинної матриксу тканини шляхом ферментативного розщеплення останнього.

5 3. Експлантація клітин.

Точно відома і відтворена щільність експлантації клітин є однією з важливих умов успішного застосування запропонованого винаходу. Щільність експлантації клітин залежить від ряду факторів, у тому числі: типу клітин і числа пасажів *in vitro*, складу культурального середовища, умов і часу культивування, площі експлантації, характеру субстрату і т.д. і повинна бути визначена експериментально перед рутинним застосуванням (на Етапі попередніх досліджень), виходячи з наступного:

- Оптимальною щільністю експлантації клітин можна вважати щільність, завдяки якій утворюються колонії, розміри яких і кількість складових їх субстрат-залежних клітин дозволяють провести статистично достовірний аналіз. При цьому кількість колоній не повинна бути занадто великою, щоб уникнути контактного гальмування проліферації клітин усередині колоній і їх злиття, що може призводити до утруднення інтерпретації результатів. Наприклад, для фібробластів дерми оптимальною щільністю експлантації є: 1-2 клітини на см².

- Точний підрахунок кількості експлантованих клітин проводять за допомогою стандартних методів, які можуть бути використані без обмежень в рамках даного винаходу.

- Вибір пасажу експлантованої клітинної культури здійснюють згідно конкретної мети: дослідження можна проводити як на клітинах первинної культури (у разі дослідження популяції фібробластів шкіри пацієнта), так і на клітинах пізніших пасажів (у разі характеристик клітинного продукту перед проведенням терапії). Очевидно, що оптимальні умови для кожного з наведених варіантів підбираються індивідуально в ході проведення контрольних досліджень.

Слід зазначити, що для отримання надійних відтворюваних результатів важливо використовувати протоколи експлантації і культивування клітин, ідентичні протоколам, встановленим на Етапі попередніх досліджень, включаючи умови культивування і набір реактивів / матеріалів. Останнє не завжди технічно можливо протягом тривалого періоду часу, наприклад, внаслідок неминучої витрати якого небудь реагенту з однієї партії. У цьому випадку, для забезпечення більш повного контролю за зазначеними умовами, даними Винаходом передбачається введення "внутрішніх клітинних стандартів" - використання культури клітин із заздалегідь відомими параметрами, що визначають регенераторний і проліферативний потенціали клітин. Даний "внутрішній клітинний стандарт" проходить всі ті ж етапи обробки та проведення аналізу, що і клітини з аналізованого зразка тканини. Потім проводять порівняння отриманих значень параметрів для "внутрішнього клітинного стандарту" з очікуваними, раніше визначеними аналогічними значеннями і, у разі їх розбіжності більш ніж на 10 %, проводять розрахунок коригуючого коефіцієнта, що враховує зміну умов проведення аналізу порівняно із стандартними. Після цього проводять розрахунок параметрів досліджуваних клітин з урахуванням коригуючого коефіцієнта.

40 4. Культивування клітин.

Підхід до визначення оптимальної тривалості даної стадії з урахуванням умов культивування і типу використовуваних клітин аналогічний викладеному вище. При цьому визначення оптимального часу інкубування клітин у культуральному середовищі та стандартизація умов є одним з критично важливих чинників отримання відтворюваних і статистично достовірних результатів.

II. Проведення статистично достовірного аналізу колоній

1. Візуалізація колоній.

Основною метою даного етапу є отримання зображення колоній, що утворилися у вигляді, зручному для аналізу, в тому числі із застосуванням засобів обчислювальної техніки і морфометричного програмного забезпечення. Дозвіл одержуваного зображення, його формат, а також - засоби для отримання самого зображення вибирають виходячи з конкретних завдань та параметрів, що характеризують клітинну культуру (див. нижче). Прикладом таких зручних технічних рішень може бути використання побутових і професійних сканувальних пристроїв, цифрової фото- і відеотехніки, оптичної та електронної мікроскопії і т.д. з отриманням електронного зображення колоній високої чіткості з роздільною здатністю не менше 800 dpi.

2. Аналіз клітинних колоній з метою кількісної оцінки параметрів, що характеризують клітинну культуру.

Метою даної стадії є оцінка об'єктивних кількісних / напівкількісних параметрів, що характеризують властивості клітинної культури за морфометричними ознаками колоній, що сформувалися і складових їх клітин. До таких параметрів можна віднести:

- загальну кількість колоній, що утворилися. Відповідно до існуючої практики [1,2], слід стандартизувати мінімальну кількість клітин, що складають колонію. Такою величиною може бути, зокрема, значення як 20, так і 50 клітин. Клони, до складу яких входить менше число клітин, колоніями не вважають і, відповідно, при підрахунку не враховують.

5 - ефективність колонієутворення. Даний параметр характеризує здатність субстрат-залежних клітин утворювати колонії і представляє відношення кількості колоній, що виростили до загальної кількості експлантованих клітин.

10 - будь-які параметри, що описують форму і розміри колоній. До таких параметрів, зокрема, можна віднести загальну площу всіх колоній, середню площу колоній, їх лінійні розміри, загальний або середній периметр колоній, розподіл їх за розмірами, частку колоній, розмір яких лежить в певному діапазоні і т.д. Наприклад, у разі введення умовних критичних величин для лінійного розміру колонії, можливий поділ колоній на "великі", "середні", "малі" та обчислення частки кожного типу таких колоній, їх співвідношення і т.п.

15 - будь-які параметри, що описують структурні та морфологічні характеристики колоній. До таких параметрів можна віднести:

- розподіл колоній за кількістю клітин, з яких вони складаються або щільність, з якою клітини розташовуються в колонії. Наприклад, у разі введення умовних середніх величин для числа клітин, з яких складаються колонії, можливий поділ колоній на "щільні", "дифузні", "змішані" і обчислення частки колоній різної щільності, їх співвідношення тощо;

20 - частка колоній з кількістю клітин, які лежать в заданому інтервалі;

- розподіл колоній за формою клітин, з яких вони складаються. Наприклад, у колоніях фібробластів шкіри розрізняють такі клітини: веретеноподібні (вузькі довгі клітини з відношенням довгої і короткої сторін більше 5), парусоподібні (великі, розміром 40 і більше мкм розпластані клітини з відношенням довгої і короткої сторін менше 3) та ін. Так, колонії, що складаються, з більш ніж 75 % веретеноподібних клітин можна позначити як "веретеноподібні", відповідно, колонії з більш 75 % парусоподібних клітин - "парусоподібні", проміжні варіанти – "змішані" колонії;

- можливе також використання будь-якої комбінації перерахованих вище методів, а також - похідних величин, отриманих з використанням зазначених вище параметрів.

30 Слід зазначити, що набір можливих параметрів не обмежується наведеним вище списком і може включати будь-які інші параметри та їх комбінації, які характеризують форму, розмір, кількість, щільність розташування і т.д. як самих колоній, так і клітин, що входять до їх складу.

III. Обробка отриманих результатів

35 Даний етап передбачає проведення аналізу отриманих значень регенераторного і проліферативного потенціалів та їх інтерпретацію. Доцільно на даному етапі використовувати математичні методи, вибір алгоритму яких залежить від досліджуваного зразка, цілей дослідження і параметрів, отриманих за допомогою клонального аналізу. На даному етапі можливе зіставлення отриманих величин, що характеризують колонії, з контрольними (середніми) значеннями, що зберігаються в базі даних або пам'яті, доступних для порівняння.

40 Метою даного етапу є оцінка параметрів, що характеризують колонії досліджуваних клітин шляхом порівняння їх значень з контрольними (середніми) величинами, отриманими на Етапі попередніх досліджень і формування висновку про стан досліджуваної клітинної популяції, тканини (органу).

45 Проведення даної стадії передбачає використання засобів обчислювальної техніки, статистичного аналізу та математичного моделювання з метою отримання об'єктивної, статистично достовірної інформації (тобто з рівнем статистичної значущості α менше 5 % (<0.05)). Кількісне визначення контрольних (середніх) значень величин проводять на підставі даних, отриманих на етапі попередніх досліджень, літературних даних або даних з інших надійних джерел.

50 Для простоти і успішності застосування винаходу можливе використання спеціально розробленої комп'ютерної системи (КС). Комп'ютерна система для діагностики включає блок формування зображення, що забезпечує оптичне розрішення не менш 800 dpi переважно - до 9600 dpi, а більш переважно - 1200-1800 dpi, блок центрального процесорного пристрою, з'єднаного з блоком оперативної пам'яті і запрограмованого проводити обробку інформації, яка отримується або безпосередньо від блоку формування зображення, або через блок введення і виведення інформації. При цьому комп'ютерна система забезпечена програмним забезпеченням для проведення статистично достовірного аналізу колоній, визначення, щонайменше, одного параметру, що характеризує регенераторний потенціал, і, щонайменше, одного параметру, що характеризує проліферативний потенціал, обробки отриманих результатів, що дозволяє оцінити регенераторний потенціал тканини (і органу) пацієнта. При

цьому порівнюють отримані значення з середніми (нормальними) значеннями, що зберігаються в базі даних або комірки пам'яті, доступні для порівняння з подальшим відображенням з можливістю вказівки діагнозу для користувача, наприклад, лікаря, пацієнта, естетика і т.д.

Дана система може включати (Фіг.1) блок центрального процесорного пристрою (ЦПУ, 1), сполученого з блоком оперативної пам'яті (ОЗУ, 2) і здатного проводити обробку інформації, одержану або безпосередньо від блоку формування зображення (БФЗ, 3), або через блок введення / виведення інформації (БВВІ, 4). Параметри, одержані в результаті обробки інформації, порівнюються зі стандартними (нормальними) значеннями, що зберігаються в базі даних на пристрої постійної пам'яті (5), що функціонує на базі пристрою постійної пам'яті комп'ютерної системи або іншому типі пам'яті комп'ютерної системи. Блок БФЗ служить для отримання цифрового зображення отриманих клітинних колоній у форматі, придатному для його подальшої обробки КС і з здатністю не менш ніж 800dpi, що забезпечує візуалізацію окремих забарвлених клітин, що входять до складу колоній. Такий блок може функціонувати на базі електронних сканувальних пристроїв планшетного типу, цифрової фото- або відеокамери та інших пристроїв формування цифрового зображення, які забезпечують необхідне розрешення.

Варіанти застосування винаходу

Зокрема, пропонується спосіб діагностики може бути застосований для оцінки стану дерми.

Рішення проблеми ефективної і безпечної корекції вікових змін шкіри є одним з важливих завдань сучасної дерматокосметології. В даний час в практиці естетичної медицини використовують великий арсенал методів корекції вікових змін шкіри обличчя і тіла. Це - мезотерапія, біоревіталізація, пілінги, фракційний фототермоліз, радіохвильовий вплив, дермаабразія та ін Основна мета застосування цих методів - стимуляція функціональної активності фібробластів - головного клітинного компоненту дерми, що відповідає за продукцію, організацію та оновлення її міжклітинної матриксу.

Відомо, що однією з причин старіння шкіри є зменшення в ній вмісту фібробластів і зниження їх біосинтетичної активності. Очевидно, що цілеспрямований вплив на дерму на клітинному рівні сприятиме як ремоделюванню її міжклітинного матриксу, так і ефективній корекції візуальних дефектів шкіри.

Практика використання сучасних косметологічних процедур і методів, спрямованих на корекцію зморшок і інших вікових дефектів шкіри показує, що їх застосування є ефективним, а в ряді випадків і безпечним, тільки при врахуванні індивідуальних особливостей шкіри пацієнта. Сучасні методи оцінки стану шкіри, особливо на клітинному рівні, є недостатньо ефективними та мають малу практичну значущість.

Завданням, на вирішення якого спрямоване запропоноване застосування винаходу, є розробка універсального способу оцінки стану дерми пацієнта, виявлення в ній змін (вікових та інших структурних) та розширення діагностичних можливостей визначення стану шкіри для підвищення ефективності та безпеки застосування наступних косметологічних процедур.

Для вирішення завдання застосований запропонований спосіб діагностики та розроблено 2 способи оцінки стану дерми людини.

1-й спосіб включає аналіз параметрів, що характеризують колонії фібробластів, який полягає у визначенні ефективності колонієутворення як параметр, що визначає регенераторний потенціал популяції клітин і відсоткової частки щільних та дифузних колоній в клітинній культурі як параметр, що визначає проліферативний потенціал клітин. Причому при значенні ефективності колонієутворення нижче 45 % для чоловіків і нижче 36 % для жінок діагностують низький регенераторний потенціал, при значенні ефективності колонієутворення в інтервалі 45-49 % для чоловіків і 36-45 % для жінок діагностують нормальний регенераторний потенціал, а при значенні ефективності колонієутворення вище 49 % для чоловіків і вище 45 % для жінок діагностують високий регенераторний потенціал, і при значенні відсоткової частки щільних колоній нижче 44 % і відсоткової частки дифузних колоній вище 25 % для чоловіків і відсоткової частки щільних колоній нижче 40 % і відсоткової частки дифузних колоній вище 40 % для жінок діагностують низький проліферативний потенціал, при значенні процентної частки щільних колоній в інтервалі 44-54 % і відсоткової частки дифузних колоній в інтервалі 20-25 % для чоловіків і відсоткової частки щільних колоній в інтервалі 40-50 % і відсоткової частки дифузних колоній в інтервалі 30-40 % для жінок діагностують нормальний проліферативний потенціал, а при значенні відсоткової частки щільних колоній вище 54 % і відсоткової частки дифузних колоній нижче 20 % для чоловіків і відсоткової частки щільних колоній вище 50 % і відсоткової частки дифузних колоній нижче 30 % для жінок діагностують високий проліферативний потенціал.

Ефективність колонієутворення розраховують, як відсоткове відношення колоній, що

утворилися з числом клітин більше 20 до загальної кількості експлантованих клітин.

Для отримання об'єктивної, статистично значущої інформації значення параметрів (тобто $\alpha < 0.05$), що характеризують колонії фібробластів, визначають з використанням засобів обчислювальної техніки, статистичного аналізу та математичного моделювання у відповідності з методами, описаними нижче.

2-й спосіб включає аналіз параметрів, що характеризують колонії фібробластів, який полягає у визначенні ефективності колонієутворення як параметр, що визначає регенераторний потенціал популяції клітин і відсоткової частки щільних, дифузних, змішаних колоній в культурі клітин і показника проліферації в якості параметра, що визначає проліферативний потенціал клітин. Причому, при значенні ефективності колонієутворення нижче 45 % для чоловіків і нижче 36 % для жінок діагностують низький регенераторний потенціал, при значенні ефективності колонієутворення в інтервалі 45-49 % для чоловіків і 36-45 % для жінок діагностують нормальний регенераторний потенціал, а при значенні ефективності колонієутворення вище 49 % для чоловіків і вище 45 % для жінок діагностують високий регенераторний потенціал, і при значенні показника проліферації нижче 2,0 для чоловіків і нижче 1,8 для жінок діагностують низький проліферативний потенціал, при значенні показника проліферації в інтервалі рівним 2,0-2,4 для чоловіків і 1,8-2,0 для жінок діагностують нормальний проліферативний потенціал, а при значенні показника проліферації вище 2,4 для чоловіків і вище 2,0 для жінок діагностують високий проліферативний потенціал.

Ефективність колонієутворення розраховують, як відсоткове відношення колоній, що утворилися, з числом клітин більше 20 до загальної кількості експлантованих клітин.

Показник проліферації визначають за формулою

$$\text{ПП} = [1 (\text{ДД}) + 2 (\text{ДЗ}) + 3 (\text{ДЩ})] / 100 \%,$$

де ПП - показник проліферації;

ДД - відсоткова частка дифузних колоній, (%);

ДЗ - відсоткова частка змішаних колоній, (%);

ДЩ - відсоткова частка щільних колоній, (%).

У приватному варіанті для отримання об'єктивної, статистично значущої інформації значення параметрів, що характеризують колонії фібробластів, визначають з використанням засобів обчислювальної техніки, статистичного аналізу та математичного моделювання.

Формування висновку та рекомендацій

Отримані показники регенераторного та проліферативного потенціалів дозволяють зробити висновки про функціональний стан популяції дермальних фібробластів і стані дерми, в цілому, у кожного пацієнта і скласти для нього індивідуальну програму корекції існуючих вікових змін шкіри.

Програма включає рекомендації по кількості процедур клітинної терапії за допомогою інтрадермального введення культивованих аутологічних фібробластів шкіри, термінів їх проведення, а також - по використанню косметологічних методів з урахуванням ступеню їх впливу на дерму з метою досягнення естетичного результату без шкоди для неї.

Зокрема, при високому регенераторному (для чоловіків понад 49 %, а для жінок - 45 %) і проліферативному (ПП для чоловіків - більше 2,4 і для жінок - більше 2,0) потенціалах пацієнтові рекомендується тільки застосування будь-яких косметологічних методів впливу на дерму, стимулюючих проліферативну активність популяції фібробластів шкіри, включаючи агресивні (наприклад, лазерні аблятивні технології).

При нормальному регенераторному (для чоловіків - 45-49 %, а для жінок - 36-45 %) і проліферативному (ПП для чоловіків - 2,0-2,4 і для жінок - 1,8-2,0) потенціалах пацієнтові рекомендується застосування курсу дермальних аутофібробластів для ділянок шкіри, які потребують корекції, з частотою 1 раз / 5 років (оскільки відомо, що синтетична активність трансплантованих фібробластів зберігається не менше 12 місяців), щодо косметологічних процедур - обмежень щодо їх застосування немає.

При низьких значеннях регенераторного (для чоловіків - менше 45 %, а для жінок менше - 36 %) і проліферативного (ПП для чоловіків - нижче 2,0 і для жінок - нижче 1,8) потенціалів пацієнтові рекомендується застосування курсу дермальних аутофібробластів для ділянок шкіри, які потребують корекції, з частотою не рідше 1 разу на 3 роки і рекомендується з обережністю застосовувати агресивні методи впливу на дерму. При цьому, чим більше отримані значення регенераторного і проліферативного потенціалів відхиляються від норми, тим більш часто слід проводити курси терапії дермальними аутофібробластами, аж до 1 разу на рік при значеннях регенераторного потенціалу для чоловіків менше 25 %, а для жінок менше 20 % і проліферативного потенціалу ПП для чоловіків нижче 1,6 і для жінок нижче 1,5.

Запропонований спосіб пояснюється наступними прикладами.

Приклад 1

Етап попередніх досліджень

Для проведення аналізу стану популяції дермальних фібробластів шкіри пацієнта були визначені середні значення параметрів колоній дермальних фібробластів пацієнтів.

5 У дослідження була включена група пацієнтів з ознаками вікових змін шкіри обличчя (наявність зморшок, зниження пружності шкіри), що складалася з 50 осіб, з яких 35 жінок і 15 чоловіків.

10 Дослідження шкіри обличчя для визначення таких характеристик, як текстура шкіри, кількість і глибина зморшок, рівень мікрогемоциркуляції, проводили за допомогою інструментальних методів дослідження шкіри:

- Дослідження гемомікроциркуляції шкіри за допомогою лазерної доплерівської флоуметрії (лазерний аналізатор кровотоку ЛАКК-01, НВО "Лазма", Росія);

- Дослідження механічних показників шкіри за допомогою вакуумного кутометра (Cutometer MPA 580, Courage+Khazaka electronic GmbH, Німеччина);

15 - Загальне дослідження мікрорельєфу та візуальних показників шкіри за допомогою фотометричної системи (VISIA, Proctor & Gamble Co, США).

Після застосування інструментальних методів дослідження шкіри визначали параметри, що характеризують колонії дермальних фібробластів.

Для цього проводили забір біоптату і культивування клітин.

20 Всі процедури проводили згідно дозволеної до застосування Росздравнаглядом РФ медичної технології "Забір, транспортування, виділення, культивування, кріоконсервування, зберігання і використання аутологічних фібробластів для корекції вікових та рубцевих дефектів шкіри" (дозвіл ФС № 2009/398).

25 Біопсію шкіри розміром 3-5мм³ проводили за відсутності у пацієнтів протипоказань за допомогою хірургічного леза одноразового використання позад вушною раковиною під місцевою інфільтраційною анестезією 2 %-м розчином лідокаїну. Виділений фрагмент шкіри негайно поміщали в промаркований стерильний контейнер з середовищем для транспортування (DMEM/F12).

30 Після доставки біоматеріалу в лабораторію його стерильно переносили в культуральну чашку Петрі, промивали розчином Хенкса з антибіотиком (гентаміцин), потім тричі промивали розчином Версена. Матеріал подрібнювали за допомогою стерильного скальпеля, додавали дезагрегуючий 0,1 % розчин колагенази та інкубували 1-1,5 години при температурі 37 °С.

35 Після інкубування тканинну суспензію інтенсивно піпетували і центрифугували протягом 10 хвилин при 300g, супернатант видаляли, осад розводили культуральним середовищем (DMEM/F12 1:1 з додаванням 10 % сироватки пуповинної крові людини (СПК) і 10 % аутологічної сироватки (АС), або DMEM/F12 1:1 з додаванням 10 % СПК і 10 % сироватки ембріонів корів (ЕК) фірми НВП "ПанЕко", Росія або FBS Defined фірми HyClone, США, або DMEM/F12 1:1 з додаванням 20 % ЗЕК фірми НВП "ПанЕко", Росія або FBS Defined фірми HyClone, США і 40 мкг / мл гентаміцину, ресуспендували і переносили в культуральний флакон. 40 Культуральний флакон поміщали в CO₂-інкубатор. Клітини культивували при +37 °С в атмосфері 5 % CO₂. Заміну культурального середовища здійснювали кожні 3-4 дні.

Після утворення субконфлюентного моношару клітини відмивали розчином Версена, потім знімали з поверхні культурального посуду розчином Версена з 0,25 % трипсину, ресуспендували в культуральному середовищі та експлантували у культуральний резервуар 45 для вирощування більшого об'єму для подальшого культивування.

Потім проводили клональний аналіз фібробластів.

50 При досягненні клітинами 2-го пасажу культуру клітин трикратно відмивали розчином Версена і трипсинізували при 37 °С, 5 % CO₂ протягом 10 хв. Гомогенат центрифугували протягом 10 хв при 300g об/хв. Супернатант видаляли, клітини ресуспендували в розчині Хенкса і робили підрахунок клітин в камері Горяєва до збігу результатів не менше 95 %.

55 Шляхом серії послідовних розбавлень готували клітинну суспензію в концентрації 100 клітин/мл. У три чашки Петрі діаметром 100 мм поміщали культуральне середовище (DMEM/F12 1:1 з додаванням 10 % СПК і 10 % АС, або DMEM/F12 1:1 з додаванням 10 % СПК і 10 % ЗЕК фірми НВП "ПанЕко", Росія або FBS Defined фірми HyClone, США, або DMEM/F12 1:1 з додаванням 20 % ембріональної сироватки корів фірми НВП "ПанЕко", Росія або FBS Defined фірми HyClone, США, і 40 мкг/мл гентаміцину) і експлантували по 1 мл розведеної клітинної суспензії для отримання клональної щільності посіву 1,5 клітин/см².

60 Чашки Петрі інкубували в CO₂-інкубаторі в умовах насиченої вологості при +37 °С в атмосфері 5 % CO₂ протягом 14 днів. Після чого культуральні чашки з колоніями, що утворилися, трикратно промивали фосфатно-сольовим розчином (PH 7,2-7,4) і фіксували 70 %

спиртом при кімнатній температурі протягом 15 хв. Потім залишки спирту видаляли триразовою промивкою дистильованою водою і проводили фарбування колоній барвником KaryoMAX® Giemsa Stain Stock Solution фірми Gibco, США протягом 20 хвилин при 37 °С. Чашки з пофарбованими колоніями ретельно відмивали від надлишку барвнику і сушили при кімнатній температурі протягом 5-7 годин.

Після цього здійснювали морфометричний аналіз колоній з визначенням середньої оптичної щільності кожної досліджуваної колонії.

Культуральні чашки поміщали в гель-документуючу систему ChemiDoc™ XRS Universalhood II фірми BioRad Inc., США і проводили сканування всієї її поверхні у видимому діапазоні світла для отримання електронного зображення колоній з роздільною здатністю не нижче 800 dpi (Фіг.2)

Отримане електронне зображення колоній обробляли за допомогою морфометричної програми ImageJ згідно алгоритму, що включає видалення фонового фарбування чашки Петрі, знаходження кордонів індивідуальних клітинних колоній, видалення артефактів зображення, що спотворюють підрахунок та аналіз колоній і обчислення середньої (за площею колонії) оптичної щільності для кожної досліджуваної колонії (Фіг. 1Б).

Підрахунок колоній проводили наступним чином.

Після виконання морфометричного аналізу, отримані показники середньої оптичної щільності переносили в програму Мікрософт Excel, де проводили загальний підрахунок колоній. Всі колонії піддавалися ранжуванню у залежності від їх середньої оптичної щільності (СОЩ) на три групи: щільні колонії (СОЩ ≥ 46 відн. од.), дифузні колонії (СОЩ ≤ 25 відн. од.) і змішані колонії ($25 < \text{СОЩ} < 46$ відн. од.).

Дослідження цих колоній проводили за такими параметрами.

Ефективність колонієутворення фібробластів, ЕКО-ф, відображає зміст клітин-попередників фібробластів в шкірі пацієнта і служить кількісним показником регенераторного потенціалу популяції дермальних фібробластів пацієнта. ЕКО-ф - це відсоткове відношення колоній, що утворилися, з числом клітин більше 20 до загальної кількості експлантованих клітин. Клони фібробластів, до складу яких входить менша кількість клітин, колоніями не вважають і, відповідно, при підрахунку не враховують.

Лінійні розміри колоній: діаметр кола (у мкм), що включає всю колонію (виконується за допомогою стандартної операції програми ImageJ).

Середня площа колоній (стандартна операція програми ImageJ) та її розподіл за числом колоній.

Кількість щільних колоній і їх частка від всіх колоній, що утворилися, з числом клітин більше 20;

Кількість дифузних колоній і їх частка від всіх колоній, що утворилися, з числом клітин більше 20;

Кількість змішаних колоній і їх частка від всіх колоній, що утворилися, з числом клітин більше 20;

Середня оптична щільність колоній (стандартна операція програми ImageJ) і її розподіл за щільним, дифузним і змішаним колоніям;

Середня оптична щільність щільних колоній, пропорційна кількості клітин, що складають колонію (стандартна операція програми ImageJ);

Показник проліферації, ПП, що визначається за формулою [Володимирська Є.Б., Кошель І.В., Цура В.М. та ін. Стромальні фібробласти нормального кісткового мозку у дітей. Гематологія № 1, 1990, с.1-4]

$$\text{ПП} = [1 (\text{ДД}) + 2 (\text{ДЗ}) + 3 (\text{ДЩ})] / 100 \%,$$

де: ПП - показник проліферації;

ДД - частка дифузних колоній, (%),

ДЗ - частка змішаних колоній, (%),

ДЩ - частка щільних колоній, (%).

Отримані параметри клітинних клонів, що характеризують популяцію дермальних фібробластів пацієнта, зіставляли з параметрами інструментального дослідження шкіри пацієнта з використанням статистичної програми BioStat за допомогою кореляційного аналізу для знаходження середніх значень параметрів (рівень статистичної значущості $\alpha < 0,05$).

Після встановлення стійкого, статистично достовірного зв'язку характеристик колоній дермальних фібробластів з характеристиками стану шкіри, отриманими за допомогою інструментальних методів дослідження шкіри за допомогою методів математичної статистики, визначали середні значення найбільш статистично значущих параметрів (з коефіцієнтом кореляції Пірсона більше 0,7): ефективність колонієутворення дермальних фібробластів (%),

частка щільних колоній (%), частка дифузних колоній (%), показник проліферації.

Для отримання об'єктивної, статистично значущої інформації на даній стадії використовували засоби обчислювальної техніки, статистичного аналізу та математичного моделювання.

Результати клонального аналізу представлені на Фіг. 3, Фіг. 4, і Фіг. 5, де показані графіки залежностей параметрів, виявлених за допомогою кореляційного аналізу Пірсона.

У таблиці 1 наведені середні значення перерахованих вище статистично значущих параметрів дермальних фібробластів залежно від статі пацієнта.

Таблиця 1

Параметр	Середнє значення параметра	
	Чоловіки	Жінки
Ефективність колонієутворення, %	45-49	36-45
Частка щільних колоній, %	44-54	40-50
Частка дифузних колоній, %	20-25	30-40
Показник проліферації	2,0-2,4	1,8-2,0

Дані значення параметрів мають відносну величину і можуть застосовуватись для порівняння та аналізу клітин, отриманих в певних суворо контрольованих умовах, таких як стандартний склад культурального середовища та умови культивування.

У разі, коли отримані поєднання величин ДД і ДП не дозволяють зробити однозначний висновок про значення проліферативного потенціалу (наприклад, для чоловіків: ДД > 25 і ДП > 54, або ДД < 20 і ДП < 54, або ДД < 20 і ДП < 44; для жінок: ДД > 40 і ДП > 50, або ДД < 40 і ДП < 40, або ДД < 30 і ДП < 40), проводять розрахунок показника проліферації (ПП), який, завдяки обліку внеску всіх видів колоній, дозволяє завжди зробити однозначний висновок про значення проліферативного потенціалу даної клітинної культури.

Приклад 2

Пацієнтка К. звернулася в клініку А з приводу корекції вікових змін шкіри обличчя (значне стоншення шкіри, наявність множинних дрібних статичних зморшок у всіх зонах обличчя). Пацієнтці 56 років, протягом останніх 5 років - менопауза. При менопаузі в значній мірі посилюються зміни шкіри, що спостерігаються з віком [Brincat M. Hormone replacement therapy and the skin. Maturitas.-2000.-V.35.-N2.-p.107-117]. Для підбору адекватної стану шкіри пацієнтки терапії була зроблена оцінка регенераторного і проліферативного потенціалів популяції її дермальних фібробластів. Для цього були проведені біопсія шкіри із завушної області та клональний аналіз з визначенням параметрів, що характеризують колонії дермальних фібробластів згідно вищеописаної методики.

Отримане електронне зображення колоній представлено на Фіг. 6А, результат їх комп'ютерної обробки для проведення морфометричного аналізу представлений на Фіг. 6Б.

Результат обрахунку розмірів і середньої оптичної щільності колоній за допомогою програми ImageJ представлені в таблиці 2.

Таблиця 2

№ колонії	Площа колонії, [відн.од.площі]	Інтегральна оптична щільність колонії, [відн.оптич.од]	Середня оптична щільність колонії	Тип колонії (результат комп'ютерного аналізу)
1	5494	242614	44,2	Змішана
2	4519	247278	54,7	Щільна
3	4388	233256	53,2	Щільна
4	4841	235662	48,7	Щільна
5	5611	120398	21,5	Дифузна
6	4599	105235	22,9	Дифузна
7	9000	133398	14,8	Дифузна
8	17902	325727	18,2	Дифузна
9	23068	466340	20,2	Дифузна
10	27136	493624	18,2	Дифузна
11	8496	130229	15,3	Дифузна

12	6285	149714	23,8	Дифузна
13	10026	192911	19,2	Дифузна
14	21193	429798	20,3	Дифузна
15	28759	381305	13,3	Дифузна
16	3230	167485	51,9	Щільна
17	8949	118966	13,3	Дифузна
18	8492	165474	19,5	Дифузна
19	25656	324053	12,6	Дифузна
20	43501	502749	11,6	Дифузна
21	3510	179474	51,1	Щільна
22	11148	712587	63,9	Щільна
23	4323	244007	56,4	Щільна
24	10415	196291	18,8	Дифузна

Отримано такі величини:

ЕКО-ф = $24/1, 5=16,0$ %, де:

- 5 24 - кількість утворених колоній з 150 експлантованих клітин,
1,5 - коефіцієнт перерахунку для обчислення % клоногенних клітин з урахуванням кількості експлантованих клітин (150 клітин/чашку).

Частка щільних колоній: $[ДЩ] = 7 \times 100 \% / 24=29,2$ %, де:

7 - кількість щільних колоній;

24 - загальна кількість колоній.

- 10 Частка дифузних колоній: $[ДД] = 16 \times 100 \% / 24=66.6$ %, де:

16 - кількість дифузних колоній;

24 - загальна кількість колоній.

Зіставлення отриманих даних, що характеризують клітинні колонії, з раніше розрахованими середніми значеннями (таблиця 1) дозволили зробити наступні висновки про стан популяції фібробластів шкіри пацієнтки:

- 15 ЕКО-ф - значно нижче середнього рівня, що свідчить про низький регенераторний потенціал фібробластів шкіри пацієнтки;

Частка щільних колоній нижче, а частка дифузних колоній вище норми, що свідчить про низький проліферативний потенціал популяції фібробластів в шкірі пацієнтки.

- 20 На підставі аналізу отриманих даних для пацієнтки К. була розроблена індивідуальна програма корекції вікових змін шкіри обличчя, яка включає: проведення курсу терапії шкіри аутологічними дермальними фібробластами, потім, через 8-12 місяців - проведення поверхневого пілінгу, або фракційного фототермолізу (на рівні папілярного шару, що не більше 3-х процедур) і через 6 місяців - повторний курс терапії шкіри аутологічними дермальними фібробластами. У результаті проведеного лікування спостерігалось значне збільшення товщини шкіри, особливо в параорбітальній області, збільшення еластичності і пружності шкіри, зменшення кількості та глибини зморшок.

Приклад 3

- 30 Пацієнтка Г. Звернулася в клініку з приводу значного стоншення шкіри в параорбітальній області після повторної блефаропластики. При візуальному огляді: шкіра в параорбітальній області була потоншена, тургор знижений, наявність множинних дрібних зморшок. Для підбору адекватної стану шкіри пацієнтки терапії була проведена оцінка регенераторного і проліферативного потенціалів популяції її дермальних фібробластів. Для цього були виконані біопсії шкіри із заушної області та клональний аналіз з визначенням параметрів, що характеризують колонії дермальних фібробластів згідно вищеописаної методикою.

Отримано вищеописаним методом параметри, що характеризують колонії фібробластів шкіри пацієнта:

ЕКО-ф - $8,3$ %;

$[ДД]$ - 19 %;

- 40 $[ДЩ]$ - 59 %.

Висновки:

ЕКО-ф - значно нижче середнього рівня, що свідчить про низький регенераторний потенціал фібробластів шкіри пацієнтки;

- 45 частка щільних колоній нижче, а частка дифузних колоній вище норми, що свідчить про низький проліферативний потенціал популяції фібробластів в шкірі пацієнтки.

На підставі аналізу отриманих даних пацієнтці було рекомендовано проведення 2-х курсів аутологічних дермальних фібробластів. Після проведеної терапії в параорбітальній області спостерігалось збільшення товщини шкіри, збільшення її еластичності і пружності, значне зменшення кількості зморшок. Пацієнтці рекомендовано повторити курс клітинної терапії через 3 роки в профілактичних цілях.

Приклад 4

Пацієнт Н. звернувся в клініку А з приводу корекції вікових змін шкіри обличчя (наявність мімічних зморшок в області "усмішки", зниження тургору шкіри).

Отримано вищеописаним методом параметри, що характеризують колонії фібробластів шкіри пацієнта:

ЕКО-ф - 60 %;

[ДД] - 24 %;

[ДЩ] - 46 %.

Висновки:

ЕКО-ф - вище середнього рівня, що вказує на високий регенераторний потенціал фібробластів шкіри пацієнта;

частка щільних і частка дифузних колоній знаходяться в межах норми, що свідчить про добрий проліферативний потенціал фібробластів шкіри пацієнта.

На підставі аналізу отриманих даних пацієнту було рекомендовано проведення будь-яких методів естетичної медицини, наявних в арсеналі клініки, для корекції вікових змін шкіри без обмежень відповідно до інструкції.

Приклад 5

Пацієнтка Д. звернулася в клініку А з приводу корекції зморшок і в'ялості шкіри. Пацієнтка 36 років з нормальним ендокринним статусом, погіршення стану шкіри сталося після застосування процедури "Thermage" в одній з московських клінік. Для з'ясування причини даних змін шкіри було проведено дослідження популяції дермальних фібробластів пацієнтки. Для цього були проведені біопсія шкіри із завушної області та клональний аналіз з визначенням параметрів, що характеризують колонії дермальних фібробластів згідно вищеописаної методикою.

Отримане електронне зображення колоній представлено на Фіг. 7А, а результат їхньої комп'ютерної обробки для проведення морфометричного аналізу представлений на Фіг. 7Б. Результат обрахунку розмірів і середньої оптичної щільності колоній за допомогою програми ImageJ представлені в таблиці 3.

Таблиця 3

№ колонії	Площа колонії, [відн.од.площі]	Інтегральна оптична щільність колонії, [відн.оптич.од]	Середня оптична щільність колонії	Тип колонії (результат комп'ютерного аналізу)
1	15215	299286	19,7	Дифузна
2	5695	97193	17,1	Дифузна
3	14526	98945	6,8	Дифузна
4	8654	103538	12,0	Дифузна
5	8524	109276	12,8	Дифузна
6	8967	159786	17,8	Дифузна
7	11949	142010	11,9	Дифузна
8	9429	69282	7,3	Дифузна
9	9618	49217	5,1	Дифузна
10	3942	159815	40,5	Змішана
11	4597	33656	7,3	Дифузна
12	11075	480888	43,4	Змішана
13	2267	24992	11,0	Дифузна
14	3609	44234	12,3	Дифузна
15	19830	1053603	53,1	Щільна
16	12351	789057	63,9	Щільна
17	20863	322777	15,5	Дифузна
18	8015	501089	62,5	Щільна
19	8185	327993	40,1	Змішана
20	8050	355112	44,1	Змішана

Продовження таблиці 3

21	1469	58104	39,6	Змішана
22	13037	154874	11,9	Дифузна
23	2326	83741	36,0	Змішана
24	6027	265022	44,0	Змішана
25	7617	61955	8,1	Дифузна
26	7151	54413	7,6	Дифузна
27	7145	337810	47,3	Щільна
28	2895	48985	16,9	Дифузна
29	7674	336033	43,8	Змішана
30	1852	65829	35,5	Змішана
31	12802	525003	41,0	Змішана
32	15872	136871	8,6	Дифузна
33	4573	186589	40,8	Змішана
34	9434	404613	42,9	Змішана
35	8320	324331	39,0	Змішана
36	12326	247570	20,1	Дифузна
37	2250	101598	45,2	Змішана
38	3729	82953	22,2	Дифузна
39	14223	100829	7,1	Дифузна
40	3589	157622	43,9	Змішана
41	4412	119878	27,2	Змішана
42	4051	43444	10,7	Дифузна
43	8478	59390	7,0	Дифузна
44	4837	222351	46,0	Змішана
45	11869	60156	5,1	Дифузна
46	3739	230874	61,7	Щільна
47	3900	99452	25,5	Змішана

Отримано такі величини:

ЕКО-ф = $47/1$, $5=31,3$ %, де:

47 - кількість утворених колоній з 150 експлантованих клітин,

5 - коефіцієнт перерахунку для обчислення % клоногенних клітин з урахуванням кількості експлантованих клітин (150 клітин/чашку).

Частка щільних колоній: $[ДЩ] = 5 \times 100 \% / 47=11$ %, де:

5 - кількість щільних колоній;

47 - загальна кількість колоній.

10 Частка дифузних колоній: $[ДД] = 24 \times 100 \% / 47=51$ %, де:

24 - кількість дифузних колоній;

47 - загальна кількість колоній.

Частка змішаних колоній: $[ДЗ] = 18 \times 100 \% / 47=38$ %, де:

18 - кількість змішаних колоній;

15 47 - загальна кількість колоній.

Показник проліферації: $[ПП] = (11 \times 3+38 \times 2+51 \times 1) / 100 \% = 1,60$.

Зіставлення отриманих даних, що характеризують клітинні колонії, з раніше розрахованими середніми значеннями (таблиця 1) дозволили зробити наступні висновки про стан популяції фібробластів шкіри пацієнтки:

20 ЕКО-ф - нижче середнього рівня, що свідчить про низький регенераторний потенціал фібробластів шкіри пацієнтки;

[ПП] - нижче середнього рівня, що свідчить про низький проліферативний потенціал популяції фібробластів в шкірі пацієнтки.

25 На підставі аналізу отриманих даних пацієнтці було рекомендовано проведення 2-х курсів клітинної терапії шкіри (з інтервалом 1 місяць) аутологічними дермальними фібробластами. Вже через місяць після проведеної терапії відзначалося збільшення еластичності, пружності і гідратації шкіри, поліпшення її текстури, зменшення кількості та глибини зморшок. Ефект мав наростаючий характер і досягав максимуму через 8 місяців після проведеної терапії.

Приклад 6

Пацієнт М. звернувся в клініку А з приводу погіршення стану шкіри обличчя після проведення в одній з клінік курсу процедур фототермічного термолізу на апараті Palomar 1450 для корекції вікових змін шкіри обличчя. Так, після проведення 3-х процедур знизився тургор шкіри, з'явилися множинні осередки атрофії дерми діаметром до 0,4 мм в області щік, шкіра

набула нездорового кольору. Отримано такі параметри, що характеризують колонії

фібробластів шкіри пацієнта:

ЕКО-ф - 10 %;

[ПП] - 1,49

Висновки:

ЕКО-ф - значно нижче середнього рівня, що вказує на низький регенераторний потенціал

фібробластів шкіри пацієнта;

[ПП] - свідчить про низький проліферативний потенціал фібробластів шкіри пацієнта.

На підставі аналізу отриманих даних пацієнту було рекомендовано проведення 2-х курсів клітинної терапії шкіри аутологічними дермальними фібробластами. Після проведеної терапії аутологічними фібробластами спостерігалось збільшення пружності та еластичності шкіри, поліпшення кольору і контурів обличчя, значне зменшення розмірів вогнищ атрофії дерми. У профілактичних цілях, повторення курсу клітинної терапії рекомендовано через 3-4 роки.

Приклад 7

Пацієнтка Р. звернулася в клініку А з приводу корекції вікових змін шкіри обличчя (наявність мімічних зморшок в області очей, виражені носогубні складки).

У результаті оцінки параметрів, що характеризують колонії фібробластів шкіри пацієнтки, були отримані наступні величини:

ЕКО-ф - 36 %;

ДЩ - 35 %

ДД - 29 %.

Зважаючи на неможливість зробити однозначний висновок про величину проліферативного потенціалу клітинної культури даного пацієнта (хоча частка дифузних колоній (ДД) помітно менше середнього значення для жінок (30-40 %), але частка щільних колоній (ДЩ) також менше норми (40-50 %)), додатково було проведено вимірювання частки змішаних колоній (ДЗ), яке

склало 36 %, і був розрахований показник проліферації (ПП), рівний 2,06.

На підставі отриманих даних був зроблений наступний висновок про стан популяції

фібробластів в шкірі пацієнтки:

ЕКО-ф - практично дорівнює середньому рівню, що вказує на нормальний регенераторний потенціал фібробластів шкіри пацієнтки;

[ПП] - свідчить про високий проліферативний потенціал популяції дермальних фібробластів.

На підставі аналізу отриманих даних для пацієнтки була розроблена індивідуальна програма корекції дефектів шкіри, що включає: застосування фракційного фототермолізу шкіри всього обличчя (згідно інструкції), через 6 місяців - курс аутологічних дермальних фібробластів для корекції зморшок в параорбітальній області та області носогубних складок.

Таким чином, запропонований винахід дозволяє проводити оцінку стану популяції фібробластів дерми пацієнта шляхом визначення об'єктивних кількісних параметрів, що характеризують регенераторний і проліферативний потенціали даних клітин.

Запропонований спосіб дозволяє отримати унікальні дані, які можуть бути корисними для визначення причини ускладнень, викликаних неконтрольованим застосуванням тих чи інших косметологічних методів, шляхом оцінки стану популяції фібробластів шкіри пацієнта. Даний спосіб може стати незамінним для прогнозування потенційних ускладнень при використанні різних косметологічних методів і процедур, а також стати корисним інструментом як для розуміння процесів, що розвиваються в шкірі при тих чи інших ускладненнях, так і для розробці індивідуальної програми корекції вікових змін шкіри у кожного пацієнта.

При проведенні описаного алгоритму аналізу клітинних колоній, враховуючи складність розрахунків і необхідність одержання об'єктивних параметрів оцінки стану тканини (і органу), в рамках даного винаходу пропонується реалізація комп'ютерної системи (КС) щодо збору, обробки та аналізу інформації, отриманої в ході виконання даного аналізу. Для здійснення різних варіантів способів діагностики передбачено використання комп'ютерних систем різної конфігурації. Детальне зображення КС представлено на Фіг.8.

КС включає канал передачі інформації (шину) 1202 чи інший механізм передачі інформації і процесор 1203, з'єднаний з шиною для обробки інформації. КС 1201 також включає блок основної пам'яті 1204 на базі блоків оперативної пам'яті типу (RAM) чи інших пристроїв динамічного зберігання інформації (наприклад, DRAM) або блоків статичної пам'яті типу SRAM або блоків синхронної динамічної пам'яті типу SDRAM, з'єднаних з шиною 1202 для зберігання

оперативної інформації та інструкцій для роботи ЦПУ 1203. Крім того, пристрій основної пам'яті може бути використано для зберігання тимчасових значень змінних чи іншої тимчасової інформації під час виконання інструкцій процесором 1203. Далі КС включає постійний запам'ятовуючий пристрій (ROM) 1205 або інший пристрій постійного зберігання інформації (наприклад, програмований постійний запам'ятовуючий пристрій (PROM), стираючий програмований постійний запам'ятовуючий пристрій (EPROM) або електрично стираючий програмований постійний запам'ятовуючий пристрій (EEPROM), з'єднані з шиною 1202 для зберігання постійної інформації та інструкцій для ЦПУ 1203.

Крім того, КС 1201 також включає контролер жорсткого диску 1206, з'єднаний з шиною 1202 для управління одним або декількома пристроями зберігання програм і інструкцій для виконання способу для визначення середнього значення. Як такі пристрої можуть використовуватися магнітний жорсткий диск 1207 і зйомні носії інформації 1208 (наприклад, дисковод флорпі-дисків, зчитувальний дисковод CD і DVD дисків, записуючий / зчитувальний дисковод CD і DVD, магнітооптичний дисковод і т.д.). Також пристрої зберігання інформації можуть бути приєднані до КС 1201 через відповідний інтерфейс (наприклад, інтерфейси SCSI, IDE, EIDE, SATA, eSATA), пристрої прямого доступу до пам'яті DMA або ultra-DMA.

Таким чином, блок основної пам'яті 1204 і / або пристрої зберігання інформації можуть бути використані для зберігання середніх (нормальних) значень або для тимчасового зберігання отриманих величин, або як засіб пошуку, запрограмованого на знаходження і витяг середніх величин з бази даних або постійної пам'яті з метою проведення їх порівняння з отриманими величинами.

Крім того, КС 1201 може також включати спеціалізовані логічні пристрої (наприклад, спеціалізовані інтегральні мікросхеми (ASIC) або найпростіші (SPLD) або складні (CPLD) мікросхеми програмованої логіки або програмовану логічну матрицю типу FPGA.

З метою більш тісної інтеграції всіх функцій запропонованого пристрою, він також може комплектуватися Блоком Формування Зображення 1211 (БФЗ), керованого контролером 1210. Блок БФЗ 1211 може функціонувати на базі будь-яких пристроїв отримання цифрового зображення, забезпечуючи оптичне розрішення не гірше 800dpi, більш переважно - не гірше 1200 dpi. В якості таких пристроїв можуть виступати, наприклад, електронні пристрої для зчитування двовимірного (плоского) зображення і подання його до растрової електронної форми (сканери), або цифрові пристрої на основі технології переносу заряду (ПЗС-матриці - приладу з зарядовим зв'язком), наприклад, цифрові відео- і фотокамери. Основною функцією блоку БФЗ 1211 є отримання цифрового зображення клітинних колоній, одержаних у відповідності з описом даного винаходу, і передача його в цифровому вигляді за допомогою контролера 1210 і шини 1202 для подальшої обробки процесором 1203 і / або для зберігання в базі даних на жорсткому диску 1207.

Також КС 1201 може включати контролер дисплея 1209, з'єднаний з шиною 1202 і необхідний для управління роботою дисплея, наприклад, на основі електронно-променевої трубки (CRT) або світлодіодної технології (LED), для відображення інформації для користувача КС. Також КС включає пристрій введення інформації, наприклад, клавіатуру і координатно-вказівний пристрій для здійснення взаємодії з користувачем і повідомлення інформації процесору 1203. Координатно-вказівним пристроєм може бути комп'ютерна миша, трек-бол або стилус. Крім того, КС може комплектуватися друкованим пристроєм для виведення інформації і даних, що зберігаються та / або отримуються в результаті дії КС 1201.

КС 1201 виробляє частину або всі етапи обчислень, передбачені даними винаходом при отриманні та виконанні ЦП 1203 однієї або декількох послідовностей інструкцій, що містяться в пам'яті, наприклад, в основній пам'яті системи 1204 для оцінки параметрів, що характеризують принаймні одну колонію клітин фібробластів шкіри людини. Такі інструкції можуть бути зчитані в основну пам'ять 1204 з іншого пристрою, такого як жорсткий диск 1207 або змінного носія інформації 1208.

Крім того, ЦП 1203 може включати:

- перший обчислювальний блок, запрограмований на визначення: (1) ефективності колонієутворення як параметра, що характеризує регенераторний потенціал клітин даного пацієнта, і (2) частки щільних і дифузних колоній в клітинній культурі як параметр, що характеризує проліферативний потенціал клітин даного пацієнта;

- компаратор (порівнювальний пристрій) для проведення порівняння отриманих для даного пацієнта значень ефективності колонієутворення і частки щільних та дифузних колоній з середніми значеннями величин ефективності колонієутворення і частки щільних і дифузних колоній для всієї популяції і,

- другий обчислювальний блок, запрограмований визначати:

(А) чи є отримане значення регенераторного потенціалу даного пацієнта низьким, нормальним або високим порівняно із середнім значенням регенераторного потенціалу всієї популяції, і

5 (Б) чи є проліферативний потенціал даного пацієнта низьким, нормальним або високим порівняно з середнім значенням проліферативного потенціалу для всієї популяції.

Крім того, КС для проведення діагностики стану шкіри пацієнта може включати:

ЦП, запрограмований проводити оцінку параметрів, що характеризують принаймні одну колонію фібробластів шкіри даного пацієнта, і містить:

10 - перший обчислювальний блок, запрограмований визначати: (1) ефективність колонієутворення в якості параметра, що характеризує регенераторний потенціал клітин даного пацієнта, і (2) частку щільних і дифузних колоній в культурі клітин в якості параметра, що характеризує проліферативний потенціал клітин даного пацієнта;

15 - компаратор (порівнювальний пристрій) для проведення порівняння отриманих для даного пацієнта значень ефективності колонієутворення і частки щільних і дифузних колоній з середніми значеннями величин ефективності колонієутворення і частки щільних і дифузних колоній для всієї популяції і,

другий обчислювальний блок, запрограмований визначати:

20 (А) чи є отримане значення регенераторного потенціалу даного пацієнта низьким, нормальним або високим порівняно із середнім значенням регенераторного потенціалу всієї популяції, і

(Б) чи є проліферативний потенціал даного пацієнта низьким, нормальним або високим порівняно з середнім значенням проліферативного потенціалу для всієї популяції.

25 Для обробки послідовності інструкцій з основної пам'яті 1204 може бути використаний один або кілька процесорів в мультипроцесорній конфігурації КС. Згідно з іншим варіантом винаходу, замість або разом з програмними інструкціями можливе виконання також інструкцій, що надходять за допомогою дротового зв'язку. Таким чином, варіанти реалізації даного винаходу не вичерпуються будь-якою комбінацією апаратних пристроїв і програмного забезпечення.

30 КС 1201 також включає комунікаційний інтерфейс 1213, з'єднаний з шиною 1202. Даний інтерфейс здійснює двосторонній обмін даними через мережеве з'єднання 1214, яке може бути пов'язане, наприклад, з локальною обчислювальною мережею (LAN) 1215 або будь-якою іншою комунікаційною мережею 1216, наприклад, Інтернет.

35 Прикладом комунікаційного інтерфейсу 1212 може виступати мережева карта для підключення до LAN з пакетною комунікацією, карта асиметричної цифрової абонентської лінії (ADSL), карта цифрової мережі з інтегрованим обслуговуванням (ISDN) або модем для забезпечення комунікації з відповідними комунікаційними каналами.

40 Мережеве з'єднання 1213 здійснює передачу даних через одну або кілька комунікаційних мереж до інших пристроїв. Наприклад, мережеве з'єднання 1213 може здійснювати з'єднання з іншим комп'ютером через локальну мережу 1214 (наприклад, LAN) або через пристрій, яким управляє постачальник послуги, що забезпечує надання послуг через комунікаційну мережу 1215. Таким чином, КС 1201 може здійснювати передачу і прийом даних через мережі 1214 і 1215, мережеве з'єднання 1213 та мережевий інтерфейс 1212. Крім того, мережеве з'єднання 2113 може також здійснювати з'єднання через LAN 1214 з мобільним пристроєм 1216, наприклад, кишеньковим комп'ютером, ноутбуком або комунікатором.

45 Комп'ютерна система забезпечена програмним забезпеченням (ПЗ), яке може зберігатися на одному або декількох пристроях зберігання / передачі інформації. Таке ПЗ здійснює функції управління КС 1201, іншими пристроями, передбаченими даними винаходом, а також надає можливість взаємодії КС 1201 з користувачем. Крім того, ПЗ може включати, наприклад, драйвери пристроїв, оперативну систему, засоби розробки ПЗ та спеціалізовані програмні продукти.

50 ПО згідно з винаходом може включати будь-які інтерпретовані або виконувані машинні коди, включаючи, наприклад, скрипти, спільні бібліотеки (DLL), скрипти на мові Java і повні виконувані програми. Зокрема, однією з головних функцій ПЗ є управління всіма стадіями проведення клонального аналізу та подальшого формування діагнозу / висновку, згідно з алгоритмом, представленим на Фіг. 9.

55 Відповідно до запропонованого алгоритму, ПЗ виконує наступну послідовність дій, які можуть бути виконані окремими програмними модулями:

60 1. Формування цифрового зображення колоній (1) - ПЗ здійснює контроль над проведенням стандартних функцій з формування цифрового зображення колоній, наприклад, що включають: включення пристрою (сканера), прогрів пристроїв, попереднє сканування, фінальне сканування вибраного фрагменту, пересилання цифрового зображення для його подальшої обробки. В

результаті виконання даної операції формується електронне зображення колоній, яке передається в КС для подальшої обробки.

2. Віднімання фоновому сигналу (3) - є першою стадією математичної обробки зображення з метою видалення фоновому сигналу для вирівнювання (нормалізації) розкиду в інтенсивності фарбування колоній, отриманих в різний час. Операція може бути виконана із залученням різних математичних методів, в тому числі методу "кульки, що котиться" із значенням радіусу не менше 50 пікселів або, більш переважно, методом "ковзаючого параболоїду" з аналогічними.

3. Знаходження меж колоній (4) - основна мета даного етапу - відокремити простір, що займає кожна з колоній, від решти не зайнятого колоніями поля цифрового зображення. Така операція може бути виконана, наприклад, за допомогою відомих методів знаходження меж між двома різнобарвленими зонами і знаходження меж об'єктів. Хороші результати можуть дати, наприклад, застосування операцій фільтрування за методами Собела, Лапласа, Превіті, Робертса та ін. Для більш достовірного і точного визначення меж колоній можуть бути використані також спеціальні математичні методи, наприклад, на основі фрактальної геометрії.

4. Видалення артефактів зображення (5) - на даному етапі обробки зображення з нього видаляються всі артефакти, які можуть перешкодити правильному підрахунку колоній і внести спотворення як за кількістю виявлених колоній, так і за їх морфологічними і метричними характеристиками. До артефактів такого роду можуть ставитися плями висохлого барвника, нерівності і знаки технологічного маркування на поверхні культурального пластика, пил та інші забруднення. Дана операція може бути виконана шляхом видалення будь-якого зображення, що лежить поза меж колоній, знайдених на попередньому етапі.

5. Підрахунок колоній і обчислення їх морфометричних характеристик (6) - метою даного етапу є отримання основних характеристик клітинних колоній, необхідних для оцінки проліферативного і регенераторного потенціалів. Кількість колоній визначають, як число дискретних об'єктів, виявлених на попередніх етапах обробки зображення. При цьому, за необхідності, розмір таких об'єктів може бути обмежений за такими параметрами як площа, периметр, квадратура та інші для обліку тільки тих колоній, які задовольняють заданому критерію відбору (наприклад, розмір, форма, щільність і т.д.).

6. Формування звіту з результатами вимірів (7) - на даному етапі проводиться формування стандартного звіту на підставі значень первинних параметрів, отриманих на попередньому етапі. До числа таких первинних параметрів відносяться величини, отримані безпосередньо в результаті вимірювань, наприклад, кількість колоній, площа кожної з колоній, середня оптична щільність кожної з колоній і т.д. При необхідності, на даному етапі також можуть бути проведені необхідні обчислення похідних величин, які можуть бути використані для безпосереднього обчислення параметрів, що характеризують регенераторний і проліферативний потенціали. До числа таких похідних параметрів можуть бути віднесені ЕКОф, питома оптична щільність кожної колонії і т.д.

7. Порівняння отриманих параметрів з їх нормальними значеннями (8), що зберігаються в БД (9) - на даному етапі проводиться порівняння отриманих параметрів з їх нормальними значеннями, що зберігаються в пам'яті КС.

8. Формування висновків та рекомендацій з лікування / профілактики (10) - на даному етапі програма робить формування висновку (11) або рекомендацій на підставі результатів порівняння обчислених параметрів і їх нормальних (середніх) значень. Дана операція може бути здійснена простим зіставленням набору заздалегідь сформульованих висновків (рекомендацій), що зберігаються в постійній пам'яті КС, з результатами порівняння параметрів, виконаних на попередньому етапі. Для проведення більш гнучкої і точної діагностики можливо також використання і більш складних логічних операцій, в тому числі із застосуванням технологій нейральних мереж і штучного інтелекту.

Запропонований спосіб діагностики універсальний і дає можливість оцінити регенеративні здібності вихідної тканини (і органу) без проведення складних і дорогих інструментальних досліджень шляхом клонального аналізу будь-яких субстрат-залежних клітин організму людини. Спосіб дозволяє отримати об'єктивну кількісну характеристику як регенераторного, так і проліферативного потенціалів даної тканини (і органу).

55 ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб оцінки стану дерми пацієнта, що включає отримання колоній фібробластів шкіри в умовах, що забезпечують формування дискретних колоній, придатних для візуалізації та визначення параметра ефективності колонієутворення фібробластів як такого, що характеризує регенераторний потенціал популяції фібробластів, та обробку отриманих

результатів, який **відрізняється** тим, що ефективність колонієутворення розраховують як процентне відношення утворених колоній з числом клітин більше 20 до загальної кількості експлантованих клітин; при цьому спосіб додатково включає визначення процентних часток щільних та дифузних колоній в культурі фібробластів як параметра, що характеризує проліферативний потенціал клітин, де щільні колонії характеризуються середньою оптичною щільністю ≥ 46 відн. од., а дифузні колонії характеризуються середньою оптичною щільністю ≤ 25 відн. од., причому при значенні ефективності колонієутворення нижче 45 % для чоловіків та нижче 36 % для жінок діагностують низький регенераторний потенціал, при значенні ефективності колонієутворення в інтервалі 45-49 % для чоловіків та 36-45 % для жінок діагностують нормальний регенераторний потенціал, а при значенні ефективності колонієутворення вище 49 % для чоловіків і вище 45 % для жінок діагностують високий регенераторний потенціал, при значенні процентної частки щільних колоній нижче 44 % та процентної частки дифузних колоній вище 25 % для чоловіків, процентної частки щільних колоній нижче 40 % та процентної частки дифузних колоній вище 40 % для жінок діагностують низький проліферативний потенціал, при значенні процентної частки щільних колоній в інтервалі 44-54 % і процентної частки дифузних колоній в інтервалі 20-25 % для чоловіків, процентної частки щільних колоній в інтервалі 40-50 % і процентної частки дифузних колоній в інтервалі 30-40 % для жінок діагностують нормальний проліферативний потенціал, а при значенні процентної частки щільних колоній вище 54 % і процентної частки дифузних колоній нижче 20 % для чоловіків, процентної частки щільних колоній вище 50 % і процентної частки дифузних колоній нижче 30 % для жінок діагностують високий проліферативний потенціал.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що значення параметрів визначають з використанням засобів обчислювальної техніки, статистичного аналізу та математичного моделювання.

3. Спосіб оцінки стану дерми пацієнта, що включає отримання колоній фібробластів шкіри в умовах, що забезпечують формування дискретних колоній, придатних для візуалізації та визначення параметра ефективності колонієутворення фібробластів як такого, який характеризує регенераторний потенціал популяції фібробластів, і обробку отриманих результатів, який **відрізняється** тим, що ефективність колонієутворення розраховують як процентне відношення утворених колоній з числом клітин більше 20 до загальної кількості експлантованих клітин, при цьому спосіб додатково включає визначення показника проліферації як процентної частки щільних, дифузних та змішаних колоній в культурі клітин як параметра, що характеризує проліферативний потенціал фібробластів, який розраховують за формулою:

$$ПП = [1(ДД) + 2(ДЗ) + 3(ДЩ)] / 100 \%$$

де ПП - показник проліферації; ДД - процентна частка дифузних колоній, (%); ДЗ - процентна частка змішаних колоній, (%); ДЩ - процентна частка щільних колоній, (%),

де при значенні ефективності колонієутворення нижче 45 % для чоловіків та нижче 36 % для жінок діагностують низький регенераторний потенціал, при значенні ефективності колонієутворення в інтервалі 45-49 % для чоловіків та 36-45 % для жінок діагностують нормальний регенераторний потенціал, а при значенні ефективності колонієутворення вище 49 % для чоловіків і вище 45 % для жінок діагностують високий регенераторний потенціал, а при значенні показника проліферації нижче 2,0 для чоловіків і нижче 1,8 для жінок діагностують низький проліферативний потенціал, при значенні показника проліферації в інтервалі, рівному 2,0-2,4 для чоловіків та 1,8-2,0 для жінок діагностують нормальний проліферативний потенціал, а при значенні показника проліферації вище 2,4 для чоловіків і вище 2,0 для жінок діагностують високий проліферативний потенціал.

4. Спосіб за п. 3, який **відрізняється** тим, що значення параметрів визначають з використанням засобів обчислювальної техніки, статистичного аналізу та математичного моделювання.

5. Спосіб індивідуальної корекції вікових змін шкіри, який **відрізняється** тим, що здійснюють діагностику шкіри у відповідності зі способом за будь-яким з пп. 1-4, після чого проводять корекцію вікових змін шкіри з урахуванням значення параметрів регенераторного та проліферативного потенціалу.

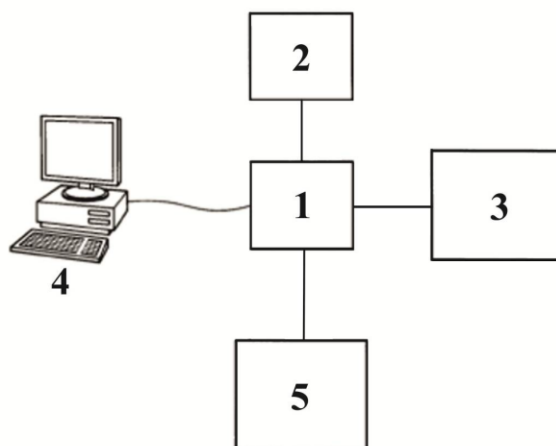


Fig. 1

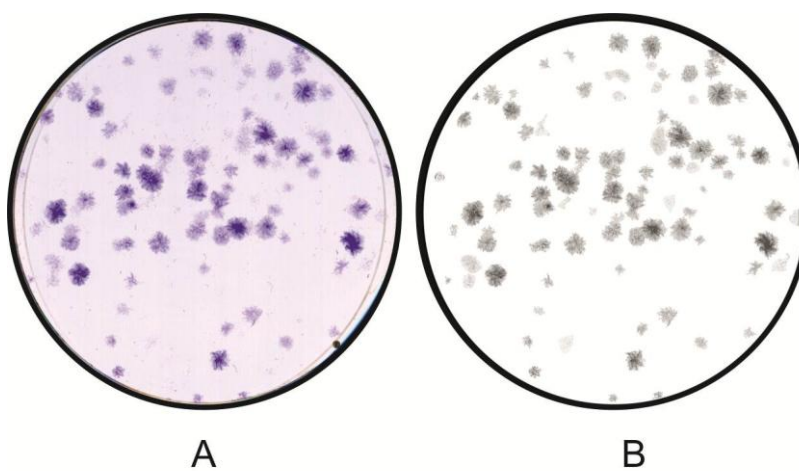


Fig. 2

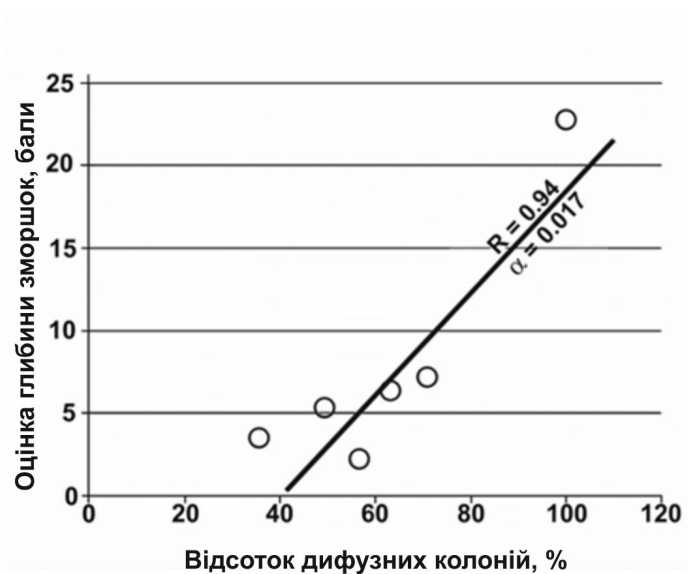
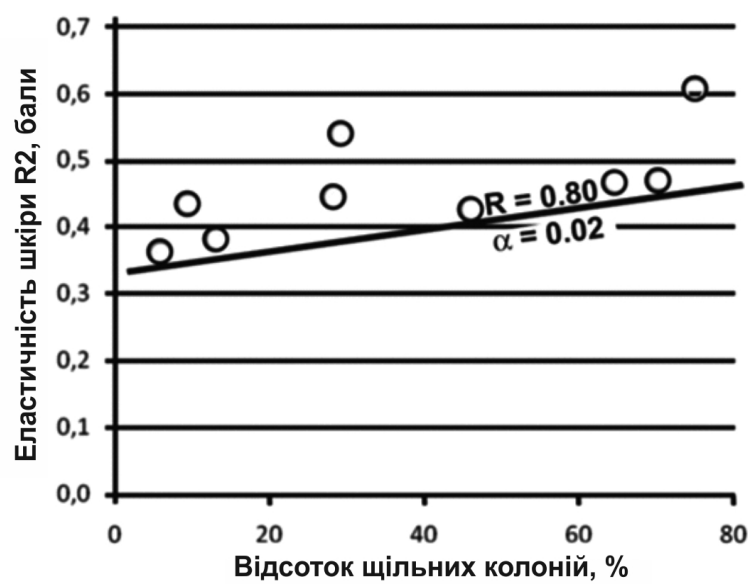
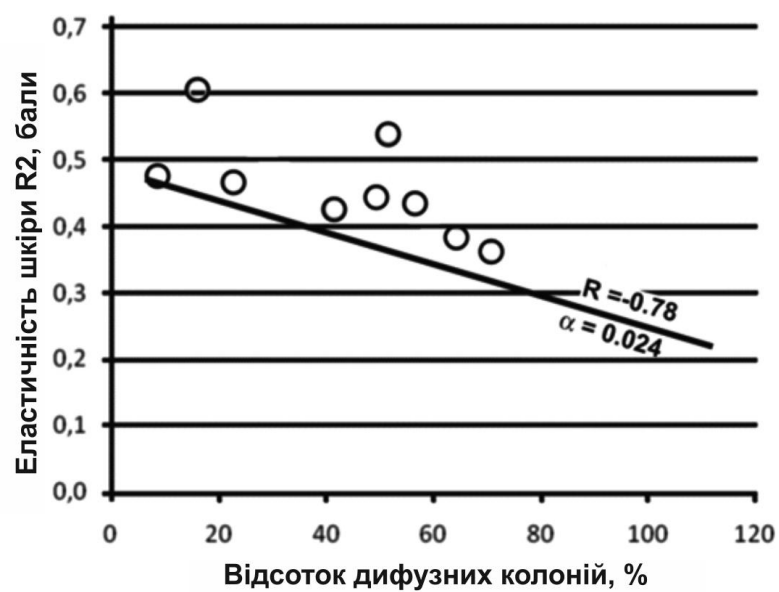


Fig. 3



Фіг. 4



Фіг. 5

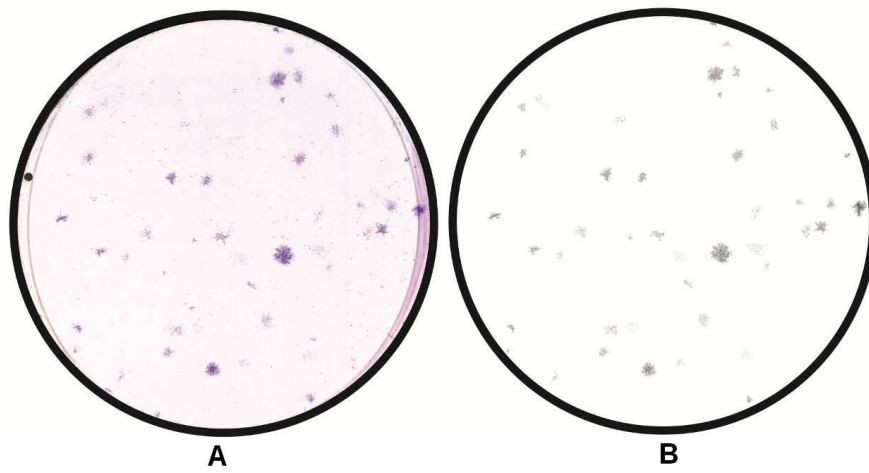


Fig. 6

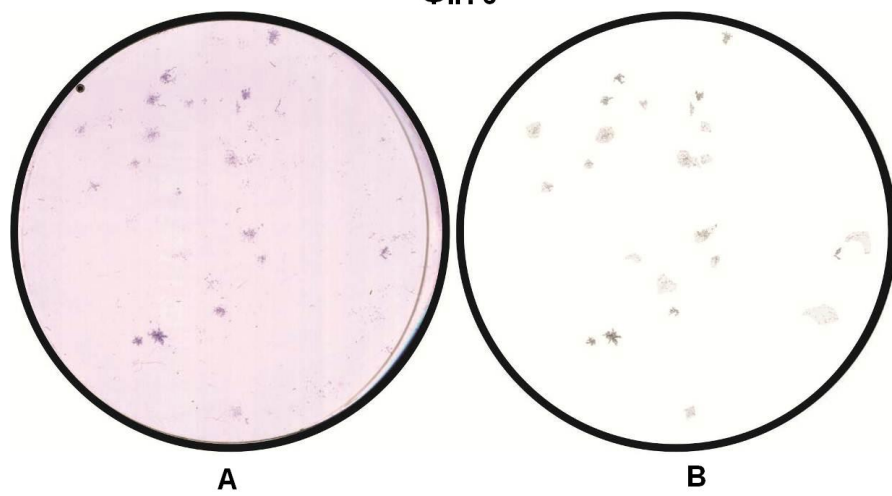


Fig. 7

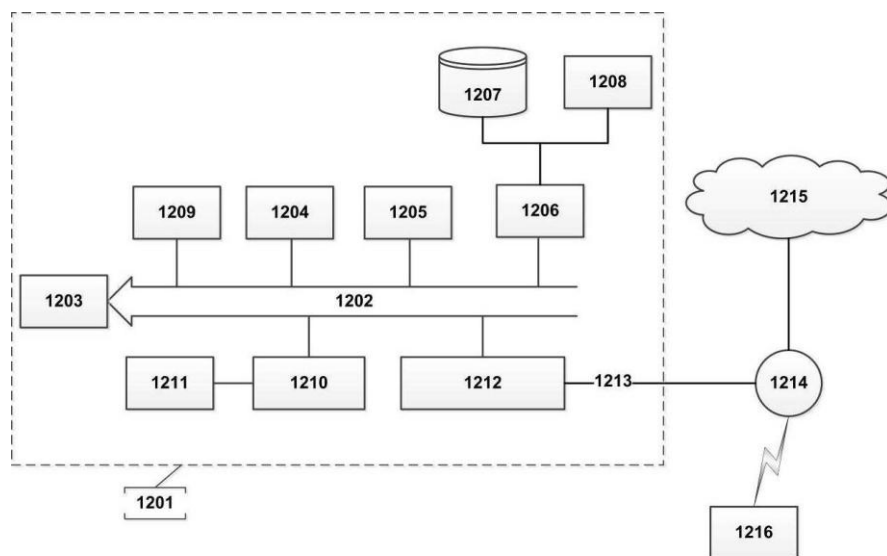
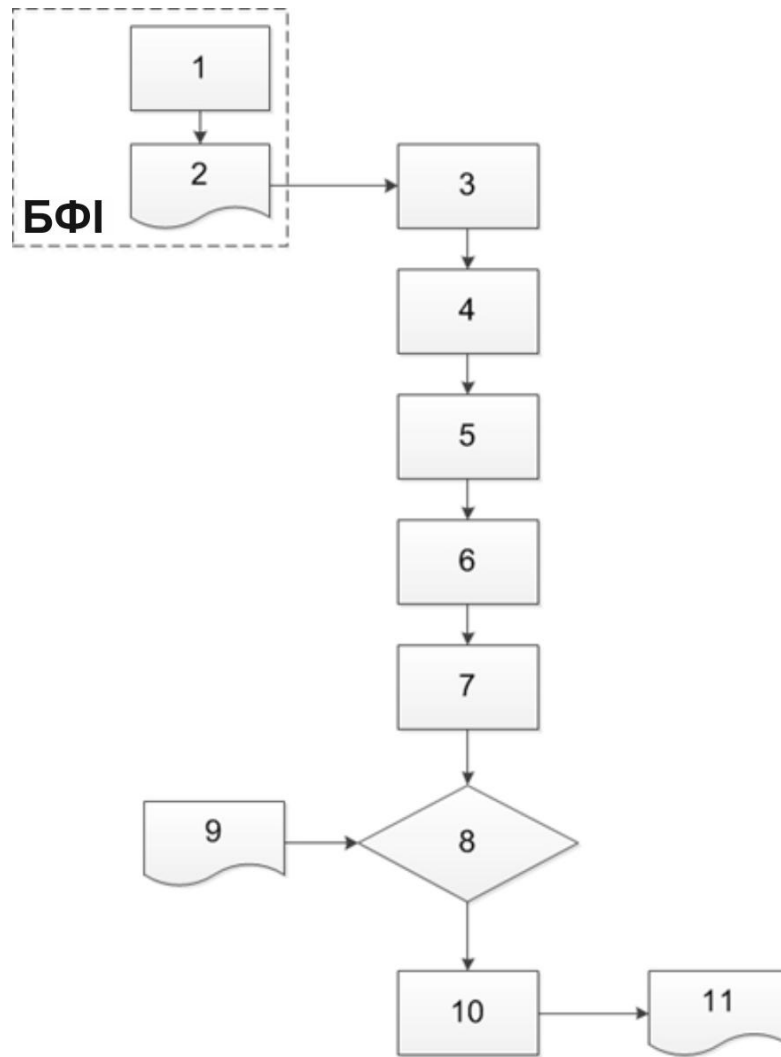


Fig. 8



Фіг. 9