



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **47699** (13) **U**
(51) МПК (2009)
A61B 10/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ**ОПИС**
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту**(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ РЕВМАТИЧНИХ ХВОРОБ У ДІТЕЙ З ДИСПЛАЗІЄЮ СПОЛУЧНОЇ ТКАНИНИ**

1

2

(21) u200906616

(22) 24.06.2009

(24) 25.02.2010

(46) 25.02.2010, Бюл.№ 4, 2010 р.

(72) ОМЕЛЬЧЕНКО ЛЮДМИЛА ІВАНІВНА, ЧЕРНИШОВ ВІКТОР ПАВЛОВИЧ, ГАЛАЗЮК ЛЮДМИЛА ВЕНІАМІНІВНА, ОШЛЯНСЬКА ОЛЕНА АНАТОЛІЇВНА

(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ПЕДІАТРІЇ, АКУШЕРСТВА І ГІНЕКОЛОГІЇ АМН УКРАЇНИ"

(57) Спосіб діагностики ревматичних хвороб у дітей з дисплазією сполучної тканини шляхом визначення показників системи імунітету, який **відрізняється** тим, що досліджуються в периферичній крові вміст імуноглобулінів, субпопуляцій лімфоцитів, аутоантитіл, функціональної активності нейтрофілів та в слині - вмісту секреторного імуноглобуліну А.

Корисна модель відноситься до області медицини, а саме ревматології, і може бути використана для діагностики аутоімунного імунопатологічного синдрому, що є раннім маркером ревматичних хвороб (РХ) у дітей з дисплазіями сполучної тканини (ДСТ), та підставою для початку їх лікування.

У дітей з ознаками ДСТ суттєво вище захворюваність на соматичну патологію, в тому числі на РХ, оскільки порушення функцій стромальних елементів організму призводить до незавершеності репаративної фази запального процесу. Дані сучасної літератури свідчать про високу частоту розвитку змін імунологічної реактивності при наявності ДСТ у дітей. Найважливіше значення серед факторів, що упереджують виникнення аутоімунних реакцій належить місцевому імунітету.

Поряд з відносно недостатнім синтезом провідного чинника місцевого специфічного імунітету - імуноглобуліну А - в дитячому віці, ще з антенатального періоду онтогенезу людини γδ-Т-клітини здатні стимулювати В₁-лімфоцити кишечника до синтезу імуноглобулінів класу М у відповідь на деякі антигени бактеріального походження. Внаслідок цього утворюються малоспецифічні антитіла, які можуть зв'язуватися з власними антигенами, що за умови порушень елімінаційних процесів (фагоцитозу, апоптозу, тощо) призводять до розвитку аутоімунітету і виникнення РХ.

У клінічній практиці випадкове виявлення циркулюючих аутоантитіл, які є традиційними маркерами аутоімунних захворювань, у дітей без клінічного симптомокомплексу РХ суттєво утруднює діагностичний процес. Ймовірність їх утворення

зростає при ДСТ в зв'язку з первинним порушенням структури тканин при ДСТ.

Важливим маркером функціональної регуляції активності імунокомпетентних клітин і проявом аутоімунітету є експресія активаційних поверхневих молекул на лімфоцитах, серед яких найбільше значення мають CD 127 та CD25. Виявлення їх відображає компенсаторні можливості організму щодо обмеження надмірної активації імунокомпетентних клітин, а кількісне їх визначення може сприяти їх ранній діагностиці у дітей з ДСТ.

Оптимальним для видалення утворених аутоантитіл з організму є апоптоз активованих аутоагресивних лімфоцитів. Попередніми дослідженнями доведено, що при РХ на лімфоцитах водночас відбувається компенсаторне підвищення експресії проапоптотичного антигену (Apo1, CD95) і вторинне підвищення маркерів антиапоптотичних процесів - bcl-2 (Омельченко Л.І., Ошлянська О.А. та співавт., 2005).

Провідним механізмом елімінації залишків клітини після її апоптозу чи руйнування цитотоксичними лімфоцитами є фагоцитоз. При ДСТ спостерігаються порушення функціональної активності нейтрофільних лейкоцитів, які відображають незавершеність процесів фагоцитозу на тлі початкове високої активності нейтрофілів (Омельченко Л.І., Ошлянська О.А. та співавт., 2008).

Всі перераховані імунологічні зсуви відмічаються у хворих на РХ та використовуються як їх додаткові лабораторні діагностичні критерії. Але провідним у діагностиці РХ, згідно затвердженим

(13) **U**(11) **47699**(19) **UA**

стандартам діагностики, залишається відповідний клінічний симптомокомплекс.

Найбільш близьким за технічною суттю є спосіб діагностики (патент Канади №CA2614103 Publication date: 2007-01-04 "Спосіб діагностики ревматизму"). Суть способу полягає в визначенні з діагностичною метою *in vitro* певних поліпептидів, асоційованих з аутоантитілами, при ревматизмі. Оцінка інших показників, асоційованих з виявленням аутоантитіл, не проводилась. Даний спосіб у дітей з ДСТ не використовувався.

Задачею корисної моделі є створення способу діагностики ревматичних хвороб у дітей з ДСТ, яка вирішується шляхом поглибленого імунологічного дослідження, яка надасть змогу з найбільшою серед існуючих способів вірогідністю діагностувати ревматичні хвороби завдяки кількісному урахуванню показників, які відображають різноспрямовані процеси в імунній системі.

Поставлена задача способу діагностики ревматичних хвороб у дітей з ДСТ вирішується шляхом визначення показників системи імунітету, згідно корисної моделі в периферичній крові додатково досліджується вміст імуноглобулінів, субпопуляції лімфоцитів, аутоантитіл, функціональна активність нейтрофілів та в слині - вміст секреторного імуноглобуліну А.

Імунологічне дослідження з визначенням у сироватці крові аутоантитіл проводилось за методиками імуноферментного аналізу й імунофлюоресценції. Вміст субпопуляцій лімфоцитів - за методом двоколірної проточної цитометрії з використанням моноклональних антитіл на проточному цитометрі FACScan з визначенням експресії CD56+, CD25+ та CD25hiCD127low+, CD95+ на CD3+-лімфоцитах, на CD3+-лімфоцитах периферичної крові. Враховуючи на те, що сучасна концепція апоптозу базується на морфологічних дослідженнях, крім кількісного визначення вмісту CD95-позитивних Т-лімфоцитів, його реалізація оцінювалась в умовних одиницях експресії Aро-1 (CD95) та bcl-2 на клітинних мембранах лімфоцитів периферичної крові з обчисленням їх співвідношення. Активність апоптозу визначали в балах відповідно до кількості клітин в полі зору мікроскопу (окуляр-10, об'єктив-40, мікроскоп "Олімпус") виявлених за допомогою непрямого стрептоavidин-пероксидазного методу візуалізації рецепторів CD-95 (Aро-1/Fas) та протеїну bcl-2 і оцінювалась за їх співвідношенням (апоптотичний індекс). Вміст імуноглобуліну А в крові та рівні імуноглобуліну А (IgA) та секреторного імуноглобуліну А (sIgA) в слині визначався методом радіальної імунодифузії в гелі за Манчіні. Слину збирали без попередньої стимуляції вранці натщесерце. Вивчення процесів фагоцитозу проводилось шляхом дослідження його активності та інтенсивності, показників НСТ-тесту (спонтанної, індукованої активності та функціонального резерву нейтрофільних гранулоцитів). Ступінь порушень оцінювався відповідно відхиленню від загальноприйнятих вікових норм.

Спосіб здійснювався наступним чином: нами були обстежені 97 дітей з клінічними ознаками ДСТ. Їх імунологічні показники порівнювали з аналогічними показниками 51 хворих на РХ дітей.

Частота виявлення аутоантитіл у дітей з ДСТ складала 24%. Частота винайдення вищезазначених аутоантитіл у хворих на РХ дітей складала 36,7%, і відповідала ступеню активності запального процесу.

У дітей з клінічними ознаками ДСТ спостерігались зміни стану місцевого імунітету у вигляді зменшення вмісту секреторного імуноглобуліну А менш вікових норм. В 80% серед дітей з ДСТ, в яких вміст секреторного імуноглобуліну А в слині був менший за 0,045г/л, спостерігалась циркуляція аутоантитіл на тлі низьких сумарних рівнів імуноглобулінів в крові.

В 29,03% випадках серед усіх дітей з ознаками ДСТ виявлене зниження спонтанного та індукованого НСТ-тесту. В 77,8% з них відмічена циркуляція аутоантитіл. В 90,1% з останніх наявність аутореактивних антитіл супроводжувалось підвищенням показників НСТ-тесту, активності та інтенсивності фагоцитозу, як і у дітей з РХ.

Результати проведеного нами дослідження виявили тенденцію до збільшення експресії CD95+ на Т-лімфоцитах у хворих на РХ, які мали ремісію захворювання. Аналогічні зміни спостерігались у дітей з реактивними артритями на тлі ДСТ. Зменшення апоптотичного індексу до 0,5 було притаманне дітям з високою активністю РХ, несприятливим перебігом РХ, а у дітей з артропатіями на тлі ДСТ супроводжувалось виявленням аутоантитіл.

Суттєве підвищення вмісту CD3+CD4+CD25hi+CD127low+ лімфоцитів периферичної крові спостерігалось при високій активності та несприятливому перебігу РХ, а при виявленні його у дітей з ДСТ воно було фактором ризику виникнення РХ. Виявлення підвищення CD3+CD4+CD25+-лімфоцитів в периферичній крові пацієнтів свідчить про аутоімунний характер запального процесу.

Достовірним для діагностики аутоімунного імунопатологічного синдрому є одночасне виявлення у дітей з ДСТ наявності гіперімуноглобулінемії та циркуляції аутоантитіл при зменшенні вмісту секреторного імуноглобуліну А в слині менш 0,05г/л, зменшенні апоптотичного індексу до 0,5, зниженні показників НСТ-тесту, зростанні співвідношення $CD8+CD127+ / ((CD3+CD56+)+(CD3+CD56+))$ більш 0,5 та зменшення співвідношення $CD8+CD127+ / CD8+CD127$ -клітин менш 0,5.

Корисна модель підтверджується наступним прикладом.

Дитина К., 5 років, хлопчик, історія хвороби №1746 за 2008 р., мати вважає хворим з 2006 р., коли після гіперінсоляції спостерігались артралгії. Обстежений, діагностований віраж туберкулінових проб, кільцевідна гранульома. Ревмопроби від'ємні. На тлі хіміопрофілактики туберкульозу відмічена поява лімфаденопатії, проведене обстеження також не виявило змін у загально клінічних аналізах. Протягом наступних 1,5 років спостерігались артралгії, рецидивні епізоди бронхообструкції. 3 травня 2007 звернули на себе увагу зміни форми колінних суглобів

Госпіталізований в червні 2008 р. в ДУ «ІПАГ АМНУ». Під час госпіталізації відмічена наявність синовітів колінних суглобів на тлі їх гіпермобільності середнього ступеню, гіпертермія до фебрильних цифр. З боку внутрішніх органів - прояви бронхообструктивного синдрому у вигляді свистячих хрипів на видихі при аускультції, кашля; болючість під час пальпації в епігастральній області, відрижки повітрям. Проведені діагностичні дослідження згідно протоколу диференційної діагностики артритів і артралгій. Виключені ревматизм, псевдотуберкульозна, ієрсиніозна, бореліозна, туберкульозна та хламідійна інфекції за результатами серологічних досліджень. Рентгенологічні зміни, дані УЗД органів черевної порожнини, ЕКГ та показники загального аналізу крові, сечі, біохімічні показники крові без суттєвих відхилень, тому вони не були патогномонічні для жодної нозологічної одиниці. Враховуючи наявність проявів синдрому бронхообструкції і численних клінічних ознак ДСТ (гіпермобільний синдром, гіпереластоз, 6 стигм диземіогенезу, фімоз, аускультативна картина відповідна пролапсу мітрального клапану) проводилась диференційна діагностика між інфекційно-алергічним артритом, хворобою Бревєра та ювенільним ревматоїдним артритом. В мазках слизу з носу еозинофіли складали 8%. Дані поглибленого імунологічного дослідження: антитіла до циклічного цетрулінованого пептиду - не визначаються, антиДНК-аттитіла - низькі не діагностичні титри, антифосфоліпідні антитіла - слабопозитивні (антикардіоліпінові класу імуноглобулінів G - 14 од

Gpl, антифосфатидилсерінові - 18 од Gpl, антифосфатидилетаноламінові - 12 од Gpl), антинуклеарні антитіла 1:640 (крапчастий тип світіння). Кількість лейкоцитів - 8250 в мкл, лімфоцитів 30,75%, CD3+ - 58,5%, CD3+ CD56+ - 8%, CD95+ - 11%, CD3+ CD4+ - 31,79%, CD3+ CD4+ CD25+ - 25,9%, CD3+ CD4+ CD25+ CD127+ - 12,1%, CD3+ CD8+ - 21,68%, імунорегуляторний індекс - 1,47, CD19+ - 24,31%, CD3- CD56+ - 16,97%, CD3- CD56+ CD8+ - 67,31%. Імуноглобулін А в сліні - 0,05г/л. НСТ-тест та активність і інтенсивність фагоцитозу - в межах норми. Апототичний індекс за даними морфологічного дослідження - 0,5.

Наявність імунологічних зсувів, притаманних аутоімунному імунопатологічному синдрому у дитини з ДСТ, дозволила при тривалості артрити менш 6 тижнів і відсутності приєднання ураження інших суглобів встановити діагноз: ювенільний ревматоїдний артрит, суглобова форма, АНА_позитивний олігоартрит, активність I ступеню, гострий бронхіт, гастроезофагеальний рефлюкс (на підставі ФГДС) та призначити терапію не стероїдними протизапальними засобами та базисне лікування. Раннє призначення терапії призвело до отримання клінічної ремісії захворювання до теперішнього часу.

Таким чином, заявлений спосіб сприятиме ранній діагностиці ревматичних хвороб і призначенню засобів вторинної профілактики, упередженню важкого перебігу і виникненню ускладнень.