



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **53192** (13) **U**  
(51) МПК (2009)  
**G01N 21/64**  
**G01N 33/48**  
**G01N 33/53**  
**G01N 33/533**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

**(54) СПОСІБ ДИФЕРЕНЦІАЛЬНОЇ ДІАГНОСТИКИ ХРОНІЧНОГО ОБСТРУКТИВНОГО ЗАХВОРЮВАННЯ ЛЕГЕНЬ І БРОНХІАЛЬНОЇ АСТМИ**

1

(21) u201004060  
(22) 07.04.2010  
(24) 27.09.2010  
(46) 27.09.2010, Бюл. № 18, 2010 р.  
(72) ПАНАСЮКОВА ОКСАНА РОМАНІВНА, КАДАН  
ЛЮДМИЛА ПАВЛІВНА, ІЛЬЄНКО ІРИНА МИКОЛА  
ЇВНА, РЕКАЛОВА ОЛЕНА МИХАЙЛІВНА  
(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "НАЦІОНАЛЬНИЙ  
ІНСТИТУТ ФТИЗІАТРІЇ І ПУЛЬМОНОЛОГІЇ ІМЕНІ  
Ф. Г. ЯНОВСЬКОГО АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК  
УКРАЇНИ"

2

(57) Спосіб диференціальної діагностики хронічно-го обструктивного захворювання легень і бронхіальної астми шляхом дослідження периферичної крові хворих, який **відрізняється** тим, що визначають інтенсивність флюоресценції в умовних одиницях CD3+ Т-лімфоцитів і при значенні показника інтенсивності флюоресценції в інтервалі від 221,0 у.о. до 419,0 у.о. діагностують хронічне обструктивне захворювання легень, а в інтервалі від 420,0 у.о. до 594 у.о. діагностують бронхіальну астму при нормі 598,1 у.о. і вище.

Корисна модель відноситься до галузі медицини, насамперед до пульмонології та клінічної імунології і може бути використана в клінічній практиці для диференціальної діагностики хронічного обструктивного захворювання легень (ХОЗЛ) та бронхіальної астми (БА).

Бронхіальна астма і хронічне обструктивне захворювання легень являють собою широко розповсюджені хронічні обструктивні хвороби, в основі яких лежить запалення дихальних шляхів. Для ХОЗЛ характерна наявність неповністю зворотної бронхіальної обструкції, яка звичайно прогресує й пов'язана з аномальною запальною реакцією легеневої тканини на вплив шкідливих часток або газів. У пацієнтів з БА контакт із агентами, що ушкоджують (особливо паління), може привести до розвитку постійної бронхіальної обструкції й запальної реакції з рисами, характерними як для БА, так і для ХОЗЛ. Таким чином, у деяких пацієнтів із хронічними респіраторними симптомами й постійною бронхіальною обструкцією диференціальна діагностика цих двох захворювань утруднена (див. Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхиальной астмы / Под ред. Чучалина А.Г. - М.: Издательский дом «Атмосфера». 2007. - С. 39).

Відомий спосіб диференціальної діагностики хронічного обструктивного бронхіту і бронхіальної

астми (див. Пат. 2178176 Российская Федерация. МПК<sup>7</sup> G01N 33/53. Способ дифференциальной диагностики хронического обструктивного бронхита и бронхиальной астмы смешанного генеза [Текст] / Павленко В.И., Ушаков В.Ф.; заявители и патентообладатели Павленко В.И., Ушаков В.Ф. - № 97114285/14; заявл. 05.08.97; опубл. 10.01.02. Бюл. № 1. - 1 с.), в якому як диференціально-діагностичний критерій БА і ХОБ використовують тип лімфоцитарних розеток, який оцінюють при дослідженні крові хворих по цитограмі гранулоцит-зв'язуючих лімфоцитів.

Однак зазначений спосіб потребує виділення окремих популяцій клітин і займає 4 години.

Найбільш близьким по технологічній суті до способу, то пропонується, є спосіб диференціальної діагностики хронічних обструктивних захворювань легень (див. Пат. 2262095 Российская Федерация. МПК<sup>7</sup> G01N 33/487. Способ дифференциальной диагностики хронических обструктивных заболеваний легких [Текст] / Максимова А.В., Гринштейн Ю.И., Шестовицкий В.А.; заявитель и патентообладатель Государственное образовательное учреждение «Красноярская государственная медицинская академия Министерства здравоохранения РФ». - № 2004105692/15; заявл. 25.02.04; опубл. 10.10.05, Бюл. № 28. - 1 с), що полягає у визначенні різного ступеню хемілю-

(13) **U**  
(11) **53192**  
(19) **UA**

мінесцентної активності фагоцитуючих клітин бронхіального дерева і при значеннях максимуму світіння спонтанної хемілюмінесценції в діапазоні від 2731 до 6200 у.о. діагностують бронхіальну астму, від 6201 у.о. і вище - хронічний обструктивний бронхіт при нормі - до 2730 у.о.

Однак зазначений спосіб передбачає проведення бронхоскопічного дослідження, яке призначається далеко не всім хворим, особливо з БА, і є досить травматичною процедурою для хворого.

В основу корисної моделі поставлена задача удосконалити спосіб диференціальної діагностики хронічного обструктивного захворювання легень і бронхіальної астми, в якому шляхом визначення інтенсивності флюоресценції CD3+ Т-лімфоцитів при дослідженні периферичної крові хворих за допомогою моноклонального аналізу, досягається підвищення точності диференціальної діагностики, що дозволяє своєчасно призначити ефективне лікування хворим з даними патологіями.

Поставлене завдання вирішується тим, що у способі диференціальної діагностики хронічного обструктивного захворювання легень і бронхіальної астми шляхом дослідження периферичної крові хворих, згідно корисної моделі, визначають інтенсивність флюоресценції в умовних одиницях CD3+ Т-лімфоцитів і при значенні показника інтенсивності флюоресценції в інтервалі від 221,0 у.о. до 419,0 у.о. діагностують хронічне обструктивне захворювання легень, а в інтервалі від 420,0 у.о. до 594 у.о. діагностують бронхіальну астму при нормі 598,1 у.о. і вище.

Спосіб здійснюють таким чином.

У хворого беруть кров з ліктьової вени в кількості 1,0 мл у пробірки, які містять антикоагулянт гепарин у концентрації 20 од/мл. Для здійснення імунофлуоресцентного аналізу проводять підготовку біоматеріалу наступним чином: на дно пластикової пробірки вносять 10 мкл моноклональних антитіл та 50 мкл біоматеріалу. Протягом 3 секунд змішують зразок на вортекс-міксері S 411 (TGL, ГДР) та інкубують протягом 20-30 хвилин у темряві, при температурі 27°C. Для лізису еритроїдних елементів використовують Lysing Solution (BD, США). За стандартним протоколом аналізу даних проточної цитометрії прямих (FSC) та бокове (SSC) світлорозсіювання використовуються для виділення трьохчасткового диференціювання популяцій клітин. Для виключення з аналізу домішок зруйнованих та загублених клітин використовують графічне встановлення регіонів. Визначення інтенсивності флуоресценції у зеленому спектрі (FITC) - перший канал флуоресценції (FL1) та у червоному спектрі (PE) - другий канал флуоресценції (FL2) проводять у логарифмічному режимі. Чітке розділення клітинних популяцій дозволяє проводити дослідження експресії лінійних та диференційних антигенів у групах обстеження. При аналізі даних імунофлуоресценції визначають відсоток позитивних клітин та інтенсивність експресії антигенів, яку оцінюють за середнім значенням каналу флуоресценції позитивних клітин (Mean Channel - M.Ch.) (див. Приложение проточної цитометрії для оцінки функціональної активності імунної системи человека [Текст]: методические рекомендации /

Институт иммунологии МОЗ Российской Федерации. - М., 2001. - 53 с.). І при значенні показника інтенсивності флюоресценції в інтервалі від 221,0 у.о. до 419,0 у.о. діагностують хронічне обструктивне захворювання легень, а в інтервалі від 420,0 у.о. до 594 у.о. діагностують бронхіальну астму при нормі 598,1 у.о. і вище.

Наводимо конкретні приклади здійснення способу.

Приклад 1. Хвора Ш-ко В.С., 1942 р.н., історія хвороби № 440, госпіталізована у відділення пульмонології та доказової медицини НІФП з діагнозом: ХОЗЛ II стадія, фаза загострення. ІХС: кардіосклероз.

При імунологічному дослідженні були одержані наступні результати: загальний відсоток Т-лімфоцитів (CD3+ Т-Лф) склав 73,5%; інтенсивність флюоресценції (ІФ) - 221,2 у.о.

На етапі обстеження і лікування хворої була виявлена обструкція бронхів, яка супроводжувалась I ступенем запалення слизової оболонки, наявністю атрофії слизової оболонки та I ступенем дистонії бронхів. Була встановлена середня клінічна важкість ХОЗЛ.

Приклад 2. Хвора Л-ко С.М., 1979 р.н., історія хвороби № 2405, госпіталізована у відділення пульмонології та доказової медицини НІФП з діагнозом: Бронхіальна астма? Нейроциркуляторна дистонія по гіпертонічному типу.

При імунологічному дослідженні були одержані наступні результати: загальний відсоток Т-лімфоцитів (CD3+ Т-Лф) склав 75,6%; інтенсивність флюоресценції (ІФ) - 437,6 у.о.

На етапі обстеження і лікування хворої була виявлена обструкція бронхів, яка супроводжувалась наявністю атрофії слизової оболонки та I ступенем дихальної недостатності. Був встановлений діагноз: Бронхіальна астма, III ступеню, середньої важкості. Нейроциркуляторна дистонія по гіпертонічному типу.

Приклад 3. Хворий К-н В.О., 1958 р.н., історія хвороби № 723, госпіталізований у відділення пульмонології та доказової медицини НІФП з діагнозом: ХОЗЛ: II стадія, помірний перебіг. Атеросклеротичний та міокардичний кардіосклероз. Гіпертонічна хвороба II ст.

При імунологічному дослідженні були одержані наступні результати: загальний відсоток Т-лімфоцитів (CD3+ Т-Лф) склав 36,8%; інтенсивність флюоресценції (ІФ) - 407,02 у.о.

На етапі обстеження і лікування хворого була виявлена обструкція бронхів, яка супроводжувалась I ступенем запалення слизової оболонки, наявністю атрофії слизової оболонки та I ступенем дистонії бронхів. Була встановлена середня клінічна важкість ХОЗЛ.

Приклад 4. Хворий Л-к Ю.М., 1952 р.н., історія хвороби № 860, госпіталізований у відділення пульмонології та доказової медицини НІФП з діагнозом: Бронхіальна астма? Псевдоалергічна кропив'янка, хронічний холецистопанкреатит.

При імунологічному дослідженні були одержані наступні результати: загальний відсоток Т-лімфоцитів (CD3+ Т-Лф) склав 44,9%; інтенсивність флюоресценції (ІФ) - 422,7 у.о.

На етапі обстеження і лікування хворого була виявлена обструкція бронхів, яка супроводжувалась наявністю атрофії слизової оболонки та I ступенем дихальної недостатності. Був встановлений діагноз: Бронхіальна астма, IV ступеню, важкий перебіг. Псевдоалергічна кропив'янка, хронічний холецистопанкреатит.

Всього за способом, що пропонується обстежено 25 хворих на ХОЗЛ, 17 пацієнтів на БА та 20 здорових донорів крові.

Однією із характеристик активності лімфоцитів є інтенсивність імунфлюоресценції клітин після прикріплення люмінісцюючих моноклональних антитіл, яка залежить від кількості специфічних рецепторів на її поверхні та її афінності (див. Інтенсивність імунфлюоресценції как один из показателей при фенотипировании лимфоцитов периферической крови пациентов с различными нарушениями иммунитета [Текст] / А.В. Симонова [и др.] // Иммунология. - 1996. - № 1. - С. 42-45).

В таблиці наведено середні дані загального

відсотка Т-лімфоцитів (CD3+), інтенсивності їх флюоресценції (ІФ CD3+) та інтервал показників інтенсивності по групах обстежених.

Як видно із таблиці, загальний відсоток Т-лімфоцитів у хворих на ХОЗЛ вірогідно нижчий, ніж у здорових осіб, а у пацієнтів на БА він знаходиться на контрольному рівні, але статистичної різниці показника між нозологічними формами не спостерігається. Більш інформативною в плані диференціальної діагностики ХОЗЛ і БА є інтенсивність флюоресценції загального пула Т-лімфоцитів, яка була вірогідно знижена як у хворих на ХОЗЛ, так і у пацієнтів на БА. При цьому активність CD3+ Т-Лф у пацієнтів на ХОЗЛ вірогідно нижче, ніж у хворих на БА. Інтервал ІФ в групі здорових донорів знаходиться на рівні 598,1у.о. і вище. Дослідним шляхом встановлено, що в групі хворих на ХОЗЛ інтенсивність флюоресценції знаходиться в межах 221,5у.о. - 419,0у.о., а у пацієнтів на БА - від 422,0 до 594,0у.о.

Таблиця

Кількість, інтенсивність флюоресценції Т-лімфоцитів та інтервал показників інтенсивності у хворих на ХОЗЛ та БА (M±m)

Групи обстежених	CD3+%	ІФ CD3+у.о.	Інтервал показників ІФ в у.о.		Відсоток обстежених, у яких ІФ знаходиться в цьому інтервалі
			від	до	
Здорові особи	69,7±1,9	630,5±6,3	598,1	680,0	100,0%
Хворі на ХОЗЛ	57,6±2,4*	396,4±9,4*	221,5	419,0	72,0%
Хворі на БА	65,8±2,2 <sup>▲</sup>	473,5±14,1 <sup>▲</sup>	420,0	594,1	88,3%

Примітки:

1. \* - різниця з показником здорових осіб вірогідна (p<0,05).

2. ▲ - різниця з показником хворих на ХОЗЛ та БА вірогідна (p<0,05).

Таким чином, у зрівнянні із прототипом у особі, що пропонується, за рахунок визначення кількісного показника інтенсивності флюоресценції CD3+ Т-лімфоцитів периферичної крові за допомогою моноклонального аналізу досягається підвищення точності диференціальної діагностики хронічного обструктивного захворювання легень і бронхіальної астми. Спосіб, що пропонується, є більш економічним за рахунок того, що виконується в рамках постановки реакції визначення рівню експресії поверхневих клітинних антигенів на CD3+ Т-лімфоцитах, яка відноситься до загальноприйнятих досліджень імунного статусу, не потребує додаткових процедур щодо збору біоматеріалу та виділення окремих популяцій клітин, результат

можна отримати через 1 годину. Окрім того, облік зразків, які містять лімфоцити, може бути проведений і за допомогою люмінесцентного мікроскопу, а не тільки лазерного проточного цитометру, що є доступним для пульмонологічних закладів різного профілю.

Визначення інтенсивності флюоресценції CD3+ Т-Лф як диференціально-діagnostичного критерію в діагностиці хронічного обструктивного захворювання легень і бронхіальної астми дозволяє своєчасно призначити ефективне лікування БА і ХОЗЛ.

Даний спосіб може знайти застосування в імунологічних лабораторіях закладів пульмонологічного профілю.