



УКРАЇНА

(19) UA (11) 58153 (13) U
(51) МПК (2011.01)
A61B 5/00
G01N 33/50 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

**(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ПОКАЗНИКІВ АПОПТОЗУ ЯК КРИТЕРІЮ АДЕКВАТНОСТІ ТЕРАПІЇ СКЛЕРО-
ДЕРМІЇ**

1

(21) u201007747
(22) 21.06.2010
(24) 11.04.2011
(46) 11.04.2011, Бюл.№ 7, 2011 р.
(72) НІКОЛАШИН ГЕННАДІЙ ВОЛОДИМИРОВИЧ,
КОЛБАСІН ПАВЛО МИКОЛАЙОВИЧ, САТАЄВА
ТЕТЯНА ПАВЛІВНА, ПІСАРЄВ АНАТОЛІЙ АРКА-
ДІЙОВИЧ
(73) САТАЄВА ТЕТЯНА ПАВЛІВНА, КОЛБАСІН
ПАВЛО МИКОЛАЙОВИЧ
(57) Спосіб визначення показників апоптозу як
критерію адекватності терапії склеродермії, що

2

включає клініко-лабораторні методи дослідження
та класифікацію процесу за ступенем тяжкості за-
хворювання, який **відрізняється** тим, що додатко-
во проводиться імуногістохімічне дослідження зра-
зків біоптатів ураженої шкіри з обробкою їх
моноклональними антитілами anti-(Fas) CD95 і
Annexin V з подальшою кількісною оцінкою
реакції, причому патологічним вважається підви-
щення рівня CD95- позитивних лімфоцитів понад
 $16,53 \pm 0,5\%$ і концентрації антитіл до Annexin V
понад $4,47 \pm 0,54$ нг / мл та наявність титру анти-
нуклеарних антитіл від 1:500 та вище.

Корисна модель відноситься до медицини, а
саме до дерматовенерології і може бути викорис-
тана для оцінки адекватності терапії, що прова-
диться у хворих на системну склеродермію.

За прототип запропонованої корисної моделі об-
раний відомий спосіб оцінки стану хворого на
склеродермію при терапії, що проводиться, яка
включає клініко-лабораторні методи дослідження
та класифікацію процесу за ступенем тяжкості за-
хворювання [С.И. Довжанский. Склеродермия. -
Саратов, 1978. - 147с.], який полягає в тому, що
оцінка стану хворого під час проведеної терапії
здійснюється в першу чергу на підставі клінічних і
серологічних показників: виявлення характерного
патерну ураженні шкіри при відсутності даних за
втягнення в процес внутрішніх органів і виключен-
ня інших дерматозів і хвороб сполучної тканини,
виявлення в крові імунних маркерів захворювання
- антинуклеарні антитіла, тощо.

Ознаками, які збігаються з важливими ознака-
ми запропонованого способу, є: визначення адек-
ватності проведеної терапії за результатами дос-
ліджень імунологічних маркерів, характерних для
аутоімунного процесу.

Причинами, які перешкоджають досягненню
очікуваного технічного результату (підвищення
ефективності оцінки адекватності терапії), є: анти-
нуклеарні антитіла, що циркулюють у крові, відо-
бражають загальний стан організму, визначаючи

фон, на якому буде протікати захворювання, для
більш точної оцінки проведеної терапії необхідно
також дослідження імуногістохімічних маркерів
шкіри безпосередньо.

Завданням запропонованої корисної моделі є пі-
двищення точності оцінки стану хворого внаслідок
проведеної терапії та віднесення його до певної
клініко-реабілітаційної групи з метою вибору пра-
вильної тактики лікування.

В основу корисної моделі поставлена задача
удосконалення способу-прототипу шляхом вве-
дження в діагностику системної склеродермії додат-
кових імуногістохімічних маркерів: CD95 - реце-
птор на поверхні клітини, здатний запускати в клітці
апоптоз після взаємодії з його лігандом FasL або
моноклональними антитілами до Fas, а також
Annexin V-FITC, який використовується для ви-
значення відсоткової частки клітин, які зазнали
апоптозу. Методика заснована на властивості клі-
тин втрачати асиметричність мембрани на ранніх
стадіях апоптозу. У апоптичних клітинах мембран-
ний фосфоліпід фосфатидилсерин - PS - транслю-
кується з внутрішньої сторони плазматичної мем-
брани на її зовнішню сторону. Інший імунологічний
маркер Annexin V як Ca^{2+} - залежний фосфоліпід -
зв'язується з протеїном, що має високу афінності до
PS, зв'язується з клітинами, що експресують PS.

Поставлене завдання вирішується тим, що в
способі визначення показників апоптозу як крите-

(19) UA (11) 58153 (13) U

рію адекватної терапії склеродермії, визначається рівень циркулюючих антинуклеарних антитіл у сироватці крові методом твердофазного імуоферментного аналізу та проводиться імуногістохімічне дослідження зрізів біоптатів ураженої шкіри з визначенням основних імуногістохімічних маркерів апоптозу шляхом приготування гістологічного препарату з біоптату шкіри з подальшою обробкою його моноклональними антитілами anti-(Fas) CD95 і Annexin V і подальшою кількісною оцінкою. За сукупністю клінічних і імуногістохімічних ознак діагностують захворювання. Причому патологічним вважається підвищення рівня CD95 позитивних лімфоцитів понад $16,53 \pm 0,5\%$ і концентрації антитіл до Annexin V понад $4,47 \pm 0,54$ нг/мл та наявність титру антинуклеарних антитіл від 1:500 та вище.

Між сукупністю важливих ознак запропонованого способу та очікуваним технічним результатом, який може бути досягнутий, проявляється наступний причинно-наслідковий зв'язок: апоптоз - форма загибелі клітини, що виявляється у зменшенні її розміру, конденсації і фрагментації хроматину, ущільненні зовнішньої і цитоплазматичної мембран без виходу вмісту клітини в навколишнє середовище. Програмована загибель у нормі є результатом реалізації генетичної програми або відповіддю на зовнішні сили і вимагає витрат енергії і синтезу макромолекул *de novo*. Є відомості, що при склеродермії генетично порушені надлишкові процеси апоптозу призводять до прогресування захворювання, яке можна вчасно діагностувати та запобігти.

Проведений заявником аналіз рівня техніки, що включає пошук по патентних і науково-технічних джерелах інформації, з виявленням джерел, які містять інформацію про аналоги технічного рішення, що заявляється, дозволяє встановити, що заявником не виявлені аналоги, які характеризуються всією сукупністю ознак, ідентичної всім суттєвим ознакам способу, який заявляється, зазначених у формулі корисної моделі.

Тому можна стверджувати, що корисна модель відповідає умові патентоспроможності за критерієм "новизна".

Спосіб полягає в наступному.

Запропонований спосіб визначення показників апоптозу як критерію адекватної терапії склеродермії здійснюється наступним чином. Спочатку проводять стандартне клінічне обстеження хворого. Визначають титр антинуклеарних антитіл у сироватці крові методом твердофазного імуоферментного аналізу. Після виявлення візуально уражених на системну склеродермію ділянок, роблять біопсію ураженої шкіри та отримані на мікротому зрізи забарвлюють імуногістохімічно за допомогою моноклональних антитіл до CD95 і Annexin V з

подальшою кількісною оцінкою. За сукупністю клінічних і імуногістохімічних ознак діагностують захворювання. Причому патологічним вважається підвищення рівня CD95-позитивних лімфоцитів понад $16,53 \pm 0,5\%$ і концентрації антитіл до Annexin V понад $4,47 \pm 0,54$ нг/мл та наявність титру антинуклеарних антитіл від 1:500 та вище.

Відомості, які підтверджують можливість використання способу. Для проведення дослідження було вибрано 120 пацієнтів, які перебували на лікуванні в Кримському республіканському клінічному шкірно-венерологічному диспансері з різними термінами захворюваності осередкової склеродермією. Контрольну групу склали 20 здорових людей. Для проведення спостереження було виділено 3 групи хворих, з різною тривалістю захворювання. Першу групу склали 47 пацієнтів з тривалістю хвороби 6-12 місяців. Другу групу - 30 пацієнтів, з терміном хвороби 1-5 років. Третю - 43 пацієнта - з термінами протікання даної патології більше 5 років. Крім того, обстежено 20 практично здорових осіб, що не страждають цією патологією, котрі склали контрольну групу. Для обліку отриманих результатів ефективності вибраної терапії використовували наступні маркери: CD95 - рецептор на поверхні клітини, здатний запускати в клітині апоптоз після взаємодії з його лігандом або моноклональними антитілами до Fas, а також Annexin V-FITC, який використовується для визначення відсоткової частки клітин, які зазнали апоптозу.

Як впливає з аналізу отриманих даних, до початку лікування у хворих на системну склеродермію мало місце посилення апоптозу - підвищення рівня CD95 позитивних лімфоцитів і антитіл до Annexin V-FITC (Таблиця). Досліджуючи кореляційні зв'язки між рівнем показників клітинного імунітету та показниками апоптозу, звернено увагу на наявність тісного зворотного кореляційного зв'язку - $r > -0,5$ - між показниками клітинного імунітету - зменшення кількості CD3+, CD4+ - і показниками апоптозу -CD95 і Annexin V. Дана зворотній кореляційний зв'язок відображає ступінь деградації клітинного імунітету. Має місце інтенсифікація процесів апоптозу за рахунок загибелі клітин CD3+ і CD4+.

Результати терапії перебували в чіткій залежності від активності апоптозу при склеродермічному процесі. Лікування, проведене в період індурації, виявилось більш ефективним, ніж у гострій і підгострій стадії при наявності запальної активності та переважання шкірної еритеми, однак стан атрофії змінювалася мало.

Таким чином, запропонована методика оцінки адекватності проведеної терапії дозволяє швидко і ефективно оцінити динаміку змін при проведеній терапії.

Таблиця

Дані показників апоптозу у хворих на системну склеродермію
залежно від тривалості захворювання ($M \pm m$)

Показники	Одиниці	Тривалість хвороби 6-12 місяців (n=47)	Тривалість хвороби 1-5 років (n=30)	Тривалість хвороби більше 5 років (n=43)	Здорові (n=20)
CD 95	10/л	0,82±0,01	0,83±0,01	0,88±0,01	0,33±0,07
	%	25,01±0,21	25,03±0,13	27,65±0,75	16,53±0,5
Annexin V	нг/мол	23,5±0,45	24,1±0,34	36,7±0,8	4,47±0,54