



УКРАЇНА

(19) UA (11) 61752 (13) U  
(51) МПК  
G01N 33/49 (2006.01)МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ  
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

## (54) СПОСІБ ОЦІНКИ СТАНУ АДАПТАЦІЇ ЗА ДОПОМОГОЮ МАРКЕРІВ АПОПТОЗУ CD95 ТА APO2.7

1

2

(21) u201100678

(22) 21.01.2011

(24) 25.07.2011

(46) 25.07.2011, Бюл.№ 14, 2011 р.

(72) ПІСАРЄВ АНАТОЛІЙ АРКАДІЙОВИЧ, КОЛБАСІН ПАВЛО МИКОЛАЙОВИЧ

(73) ПІСАРЄВ АНАТОЛІЙ АРКАДІЙОВИЧ, КОЛБАСІН ПАВЛО МИКОЛАЙОВИЧ

(57) Спосіб оцінки стану адаптації за допомогою маркерів апоптозу CD95 та APO2.7, що включає аналіз периферичної крові пацієнтів з використанням проточної цитометрії та маркера-рецептора

CD-95 як індуктора апоптозу, який відрізняється тим, що додатково використовують маркер-антигену APO2.7 (так званого 7A6), який з'являється на мембрані мітохондрії на ранніх стадіях апоптозу клітин і при значеннях  $0,35 \pm 0,07$  ум. од. для CD95 та  $4,51 \pm 0,55$  ум. од. для APO 2.7 відповідно судять про нормально виражений процес адаптації, при відхиленні від значень показників в бік зростання для CD95 більше ніж  $0,79 \pm 0,04$  ум. од. та  $21,5 \pm 0,78$  ум. од. для APO 2.7 судять про можливість розчистки процесів дизадаптації.

Корисна модель належить до медицини, а саме до педіатрії, і може бути використана в санаторно-курортній практиці для оцінки стану адаптації у часто і тривало хворіючих дітей.

Як найближчий аналог (прототип) вибрано «Спосіб оцінки стану адаптації» (Гаркави Л. Х., Квакина Е. Б., Уколова М. А. «Адаптационные реакции и резистентность организма». - Ростов-на-Дону: издательство Ростовского университета, 1990. - 223 С.), який включає дослідження крові і, за отриманими результатами, використання лейкоцитарної формули для визначення адаптаційних процесів.

Задачею дійсної корисної моделі є вдосконалення способу оцінки стану адаптації шляхом визначення показників маркерів апоптозу нейтрофілів периферичної крові з досягненням технічного результату - раніше виявлення патологічного процесу.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі оцінки стану адаптації за допомогою маркерів апоптозу CD95 та APO2.7, який включає використання проточної цитометрії та маркера-рецептора CD-95 як індуктора апоптозу, додатково використовують маркер-антигену APO2.7 (так званого 7A6), який з'являється на мембрані мітохондрії на ранніх стадіях апоптозу клітин і при значеннях  $0,35 \pm 0,07$  ум. од. для CD95 та  $4,51 \pm 0,55$  ум. од. для APO 2.7 відповідно судять про нормально виражений процес адаптації, при відхиленні від значень показників в бік зростання для CD95 більше ніж  $0,79 \pm 0,04$  ум. од. та  $21,5 \pm 0,78$  ум. од. для APO 2.7 судять про можливість розчистки процесів

дизадаптації.

Спільними з прототипом ознаками є:

- використання периферичної крові для її цитохімічного аналізу.

Відмінністю від прототипу є:

- використання додатково маркера-антигену APO2.7 (так званого 7A6), який з'являється на мембрані мітохондрії на ранніх стадіях при апоптозі клітин;

- використання проточної цитометрії;
- використання маркера-рецептора CD-95 як індуктора апоптозу.

Причинно-наслідковий зв'язок між суттєвими ознаками, що заявляються, і технічним результатом полягає у такому.

Дійсно, досягнення вказаного технічного результату - раннє виявлення патологічного процесу - можливо тільки при здійсненні всіх ознак, вказаних у формулі корисної моделі.

Запропонований комплекс діагностичних заходів приводить до раннього виявлення посилення апоптозу (підвищення рівня CD95 та експресії APO2.7) під час захворювання за рахунок використання антигену APO2.7 (так званого 7A6), який з'являється на мембрані мітохондрії на ранніх стадіях апоптозу клітин, що у свою чергу дозволяє виявити раннє посилення апоптозу (підвищення рівня CD95 та експресії APO2.7) під час виникнення процесів дизадаптації.

Спосіб оцінки адаптації на ранніх стадіях захворювання включає застосування наступних маркерів: CD95 - рецептор поверхні клітини, здатний запускати в ній апоптоз після взаємодії його з Fas-

(13) U  
(11) 61752  
(19) UA

лігандом або моноклональними антитілами до Fas, APO2.7 - для визначення відсоткової частки клітин, які зазнали апоптозу.

Методика заснована на властивості антигену APO2.7 (так званого 7A6) з'являтися на мембрані мітохондрії апоптозних клітин.

Експресія APO2.7 визначається на ранніх стадіях апоптозу, приблизно за один-два тижня в порівнянні з прототипом. Так само APO2.7 може виявлятися в клітинах після впливу радіації, обробки лікарськими засобами або зв'язування CD-95 з Fas-лігандом.

Живі клітини негативні або слабо позитивні до цього антигену.

Проведений заявниками аналіз рівня техніки, який включає пошук за патентними і науково-технічними джерелами інформації, з виявленням джерел, що містять інформацію про аналоги технічного рішення, яке заявляється, дозволяє встановити, що заявником не виявлені аналоги, які характеризуються всією сукупністю ознак, ідентичною всім суттєвим ознакам способу, що заявляється, вказаних у формулі корисної моделі.

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

Крім того, корисна модель промислово застосовна, тому що технічне рішення, що заявляється, дозволяє використовувати його при ранньої діагностики вогнищевої склеродермії.

Можливість здійснення корисної моделі, що заявляється, підтверджується нижчеприведеним описом її практичної реалізації.

Заявлений спосіб оцінки стану адаптації за допомогою маркерів апоптозу CD95 та APO2.7 CD95 та APO2.7 включає використання проточної цитометрії та маркера-рецептора CD-95 як індуктора апоптозу, а також додаткове використання маркера-антигену APO2.7 (також званого 7A6), який з'являється на мембрані мітохондрії на ранніх стадіях при апоптозі клітин.

Спосіб здійснюють наступним чином.

При знаходженні дітей на санаторно-курортному етапі проводять лікування та обстеження. Здійснюють забір периферичної крові і досліджують цитохімічні показники в нейтрофілах, далі аналізують отримані результати. Для проведення дослідження вибирають 30 пацієнтів з порушенням адаптаційних процесів на ранніх стадіях захворювання.

Контрольну групу складають 10 здорових дітей.

Автори заявленого способу скористалися сучасною технологією швидкого оптичного вимірювання параметрів клітинних процесів, які тривають в ній - проточної цитометрії. В даний час проточна цитометрія застосовується для виявлення певних клітин в досліджуваних зразках (як бактеріальних і грибкових, так і власних клітин організму людини), визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів, а також моніторингу стану вірусного процесу у ВІЛ-інфікованих пацієнтів.

Для обліку отриманих результатів ефективно-сті терапії за даним способом використовують наступні маркери: CD95 - рецептор поверхні клітини,

здатний запускати в ній апоптоз після взаємодії його з Fas-лігандом або моноклональними антитілами до Fas, APO2.7 - для визначення відсоткової частки клітин, які зазнали апоптозу.

Ця методика заснована на властивості антигену APO2.7 (також званого 7A6) з'являється на мембрані мітохондрії апоптозної клітини.

Експресія APO2.7 визначається на ранніх стадіях апоптозу.

Так само APO2.7 може виявлятися в клітинах після впливу радіації, обробки лікарськими засобами або зв'язування CD-95 з Fas-лігандом.

Живі клітини негативні або слабо позитивні до цього антигену.

Матеріалом дослідження заявленого способу є периферична кров дітей, які знаходилися на санаторно-курортному етапі реабілітації.

Аналіз отриманих даних показує, що у дітей на початковій стадії відхилень процесів адаптації має місце посилення апоптозу (підвищення рівня CD95 та експресії APO2.7, що говорить про розвиток процесів дизадаптації).

Ступінь деградації клітинного імунітету відбивається у зворотному кореляційному зв'язку між показниками клітинного імунітету (зменшення кількості CD3+ і CD4+) і показниками апоптозу (зростання CD95 і APO2.7).

Інтенсифікація патологічного процесу має місце за рахунок загибелі клітин CD3+ і CD4+.

Як впливає з аналізу отриманих даних, у хворих дітей з відхиленням від норми стану адаптації шляхом визначення показників маркерів апоптозу нейтрофілів периферичної крові мало місце посилення апоптозу (підвищення рівня CD95 позитивних лімфоцитів і APO2.7).

Досліджуючи кореляційні зв'язки між рівнем показників клітинного імунітету та показниками апоптозу, ми звернули увагу на наявність тісного зворотного кореляційного зв'язку ( $r > -0,5$ ) між показниками клітинного імунітету (зменшення кількості CD3+, CD4+) і показниками апоптозу (підвищення рівня CD95 і APO2.7).

Дані зворотного кореляційного зв'язку відображають ступінь деградації клітинного імунітету. Має місце інтенсифікація процесів апоптозу за рахунок загибелі клітин CD3+ і CD4+.

Відхилення від норми стану адаптації шляхом визначення показників маркерів апоптозу нейтрофілів периферичної крові перебувало в чіткій залежності від проведених лікувальних заходів на етапі санаторно-курортної реабілітації.

Застосування запропонованого способу оцінки стану адаптації у дітей тривало і часто хворіючих, що заключається у визначенні показників маркерів апоптозу CD95 та APO 2.7 підтверджується наступними прикладами його виконання.

Приклад 1

Дитина С., 13 років була прийнята до санаторію. Було проведено дослідження запропонованим способом. Показники апоптозу нейтрофілів периферичної крові становили -  $0,34 \pm 0,07$  ум. од. для CD95 та  $4,57 \pm 0,55$  ум. од. для APO 2.7, що відповідає нормі та нормально вираженим процесам адаптації.

Приклад 2

Дитина Л., 15 років була прийнята до санаторію. Було проведено дослідження запропонованим способом. Показники апоптозу лейкоцитів периферичної крові становили  $0,75 \pm 0,04$  ум. од. для CD95 та  $17,4 \pm 0,78$  ум. од. для APO 2.7. Зростання показників апоптозу нейтрофілів периферичної крові свідчило про процеси дезадаптації, що розвинулися.

Запропонований спосіб дозволяє вирішувати проблему оцінки стану адаптації і може бути широко використаний на санаторно-курортному етапі лікування дітей, тривало і часто хворіючих.

Таким чином, можна констатувати, що заявлений спосіб дозволяє виявити перші ознаки відхи-

лення від норми стану адаптації шляхом визначення показників маркерів апоптозу нейтрофілів периферичної крові на ранніх стадіях захворювання - за 1-2 тижня в порівнянні з прототипом, що значно покращує результати і проведення лікувальних заходів на етапі санаторно-курортної реабілітації.

З огляду на все вищезгадане можна констатувати, що задача, поставлена в дійсній корисній моделі - розробка способу оцінки стану адаптації шляхом визначення показників маркерів апоптозу нейтрофілів периферичної крові - виконана з досягненням технічного результату - раннє виявлення патологічного процесу.