



УКРАЇНА

(19) UA (11) 12249 (13) U
(51) МПК (2006)
G01N 33/48
A61B 5/1455 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ ЦИТОКІНО-ІМУННОГО СТАТУСУ У ХВОРИХ З НАСЛІДКАМИ ІШЕМІЧНОГО ІНСУЛЬТУ

1

(21) u200509780
(22) 18.10.2005
(24) 16.01.2006
(46) 16.01.2006, Бюл. № 1, 2006 р.
(72) Бровченко Маріанна Станіславівна, Цимбалюк Віталій Іванович
(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ
(57) Спосіб оцінки цитокіно-імунного статусу у хворих з наслідками ішемічного інсульту шляхом дослідження крові, який **відрізняється** тим, що додатково визначають показники CD3, CD4, CD8, CD19, CD16, CD54, CD25, CD95 та рівні фактора

2

некрозу пухлин, інтерлейкіну-1, інтерлейкіну-4, інтерлейкіну-6, в якому за рахунок виявлення характерних критеріїв, а саме зниження імунорегуляторного показника від $1,18 \pm 0,13$ і нижче, підвищення СВ95лімфоцитів від $7,64 \pm 0,68$ і вище, підвищення вмісту інтерлейкіну-6 від $18,25 \pm 2,2$ і вище, нормального вмісту фактора некрозу пухлин в межах $52,02 \pm 4,7$, інтерлейкіну-1 в межах $45,02 \pm 4,6$, інтерлейкіну-6 в межах $7,0 \pm 0,96$ та підвищення вмісту протизапального інтерлейкіну-4 від $137,02 \pm 9,1$ і вище - оцінюють стан цитокіно-імунного статусу.

Корисна модель відноситься до медицини, а саме до неврології і може бути використана для додаткового обстеження хворих з наслідками ішемічного інсульту.

Судинні захворювання головного мозку, через високу розповсюдженість та високий рівень інвалідизації, являють собою одну з найважливіших медичних та соціальних проблем сьогодення. Останнім часом в світі спостерігається зростання кількості цереброваскулярних захворювань. Велику частину серед них займають мозкові інсульти, щорічно вражаючи від 5,6 до 7,0млн. та забираючи життя 4,6млн. людей на планеті. Також актуальна ця проблема і в Україні, де щорічно фіксується 110-130 тисяч інсультів. Смертність від цереброваскулярної патології займає друге місце в структурі загальної смертності населення нашої країни.

Аналіз захворюваності на цереброваскулярну патологію в Україні вказує на значний її ріст і вона займає одне із перших місць в Європі. Прослідковується з роками негативна тенденція. Так, якщо в 1991 році було зареєстровано 233 випадки на 100тис. населення, то в 2000 році - 266,3, тобто по відношенню до 1991 року кількість інсультів виросла в 1,6 разів.

Дослідження останніх років значно розширили, а в більшості змінили бачення про закономірності мозкового кровообігу в нормі і патології, розкрили конкретні механізми різних форм судинних уражень головного і спинного мозку [1, 2, 3]. Проте

вивчені ще не всі механізми розвитку гострих ішемічних порушень мозкового кровообігу. У зв'язку з тим зрозумілий інтерес до вивчення у хворих з наслідками ішемічного інсульту нових ланок патогенезу, з метою вибору тактики лікування та попередження ускладнень і покращення якості життя пацієнтів.

Відомий спосіб обстеження хворих з наслідками ішемічного інсульту запропонований шведськими вченими [4] шляхом визначення кількості мононуклеарних клітин з експресією IL-8, IL-1B та IL-17 в СМР та плазмі, при якому оцінюють ступінь вираженості неврологічного дефіциту та кореляцію ($P < 0,01$) з вмістом вказаних цитокінів. Ступінь неврологічного ушкодження встановлювався у всіх хворих з ішемічним інсультом відповідно до Скандинавської шкали інсультів на початку та при подальших обстеженнях. Величини СШІ знаходились в діапазоні від 8 до 58 балів. При високому ступені неврологічного ушкодження (низькій кількості балів за СШІ) хворі мали високе число мононуклеарних клітин з експресією IL-8, IL-1B та IL-17. Даний метод обстеження має обмеження, тому що ця зворотня кореляція залишалась значущою тільки для IL-8. Решта показників вже через 31 добу не відрізнялись від значень у здорових осіб контрольної групи. Таким чином проводити обстеження хворих з наслідками ішемічного інсульту в більш пізні реабілітаційні періоди за допомогою цього методу недоцільно.

(13) U

(11) 12249

(19) UA

Найбільш близьким до запропонованого методу є спосіб визначення прозапальних цитокінів IL-6 та ФНП в плазмі та СМР пацієнтів з ішемічним інсультом [7]. Автори проаналізували результати обстеження питокинового статусу у 231 пацієнта з ішемічним інсультом. Наявність неврологічного погіршення визнавалась при зниженні хоча б на один бал за Канадською шкалою оцінки інсульту протягом перших 48 годин. Вісімдесят три пацієнти (35,9%) мали погіршення стану протягом перших 48 годин. Рівні IL-6 у плазмі ($>21,5$ пг/мл) та в СМР ($>6,3$ пг/мл) були незалежними факторами раннього клінічного погіршення у хворих з ішемічним інсультом. Зв'язок зберігав статистичну достовірність для всіх підтипів ішемічного інсульту, а також для всіх осіб з корковими та підкорковими інфарктами. Існуючий метод обстеження має суттєве обмеження, яке пов'язане з тим, що використовується лише один критерій, що знижує широту обстеження. Недоліком даного способу є відсутність дослідження процесів активації та апоптозу в лімфоцитах хворих, що могло б значно покращити рівень обстеження даної групи хворих.

Дослідженнями останнього часу встановлений складний інтегральний зв'язок між морфофункціональними елементами нервової, ендокринної та імунної систем, про що свідчить наявність спільних рецепторів до лімфокінів, нейропептидів, нейрогормонів на плазматичних мембранах, клітин нервової та імунної систем організму. Показано, що нейроімунні зв'язки при різних захворюваннях нервової системи можуть змінюватись і тим самим призводити до зрушень функції імунної системи, розвитку аутоімунних реакцій до антигенів мозку, і таким чином впливати на перебіг ішемічного інсульту [5, 6]. Незважаючи на суттєві успіхи у вивченні патологічних процесів, що призводять до зрушень функції імунної системи при ішемічному інсульті, послідовність їх виникнення, взаємозв'язок та вплив на перебіг реабілітаційного періоду потребують уточнення.

В основі корисної моделі поставлена задача удосконалення способу обстеження хворих з наслідками ішемічного інсульту, в якому за рахунок виявлення характерних критеріїв при проведенні обстеження цитокіноімунного статусу, а саме визначення в крові основних субпопуляцій лімфоцитів (CD3, CD4, CD8, CD19, CD16, CD54), визначення активаційних та апоптотичних антигенів лімфоцитів (CD25, CD95) та визначення рівнів фактору некрозу пухлин, інтерлейкіну-1, інтерлейкіну-4, інтерлейкіну-6, а також оцінки неврологічного статусу, визначається вид нейрогенного імунodefіциту та розкриваються можливості для його корекції.

Технічний результат, отриманий від вирішення поставленої задачі буде полягати у чіткому виявленні нейроімунних змін, що сприятиме своєчасному вибору відповідної тактики лікування хворих з наслідками ішемічного інсульту, попередженню ускладнень та покращенню якості життя пацієнтів.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі обстеження хворих з наслідками ішемічного інсульту шляхом дослідження крові, відповідно до корисної моделі визначають показники CD3, CD4, CD8, CD19, CD16, CD54, CD25, CD95 та рівні

фактору некрозу пухлин, інтерлейкіну-1, інтерлейкіну-4, інтерлейкіну-6, які характеризують вираженість запальних процесів та ступінь нейроімунних порушень. У хворих з вираженим неврологічним дефіцитом спостерігалось достовірне зниження імунорегуляторного показника від $1,18 \pm 0,13$ і нижче. Високий відсоток CD95 лімфоцитів - свідчить про підвищену готовність до апоптозу імунокомпетентних клітин, від $7,64 \pm 0,68$ і вище.

Нормальний вміст прозапальних цитокінів: фактору некрозу пухлин ($52,02 \pm 4,7$), інтерлейкіну-1 ($45,02 \pm 4,6$), інтерлейкіну-6 ($7,0 \pm 0,96$), та підвищений вміст протизапального інтерлейкіну-4 (до $137,02 \pm 9,1$ і вище), який дозволяє "загасити" локальне вогнище запалення. Підвищений вміст інтерлейкіну-6 ($18,25 \pm 2,2$ і вище) свідчить про максимальну активність запальних реакцій, та свідчить про те що хворий потребує призначення імунокорегуючої терапії.

Спосіб здійснюється наступним чином:

У дослідженні брали участь 48 пацієнтів віком від 40 до 65 років з наслідками ішемічного інсульту в різні періоди хвороби, під час проведення реабілітаційного лікування, та 25 практично здорових осіб контрольної групи. Всі обстежувані були пацієнтами неврологічного відділення та міського центру нейрореабілітації Київської міської клінічної лікарні №18.

Діагноз будовався на клінічному анамнезі, обстеженні неврологічного статусу та КТ або МРТ головного мозку. У всіх пацієнтів під час проведення КТ або МРТ дослідження було виявлено ознаки ішемічних уражень різної локалізації та розмірів. Хворі з нещодавно перенесеною інфекцією в анамнезі, з серцевими, нирковими, печінковими, аутоімунними, онкологічними, ендокринними та іншими соматичними захворюваннями, до обстеження не включались. Також, не включались до обстеження пацієнти з повторними порушеннями мозкового кровообігу та ті, що перенесли черепно-мозгову травму. В усіх хворих проводився контроль звичайних стандартних показників крові. Жоден хворий не мав підвищення кількості лейкоцитів, не було також, змін показників цукру крові та біохімічних показників. Кожному хворому двічі на день проводилась термометрія (відхилень від нормальних показників у жодного пацієнта зафіксовано не було).

Ступінь порушень неврологічного статусу оцінювався за шкалами Бартела та чотирьохбальної оцінки в день госпіталізації та кожні 10 днів перебування в стаціонарі. Пацієнтам проводилось нейроімунологічне обстеження шляхом визначення основних субпопуляцій лімфоцитів (CD3, CD4, CD8, CD19, CD16, CD54) за допомогою моноклональних антитіл, визначення активаційних та апоптотичних антигенів лімфоцитів (CD25, CD95) методом проточної цитофлюориметрії, визначення методом імуноферментного аналізу рівнів фактору некрозу пухлин, інтерлейкіну-1, інтерлейкіну-4, інтерлейкіну-6. Безпечність методу та відсутність будь-яких навантажень на пацієнта дозволяє проводити обстеження в різні реабілітаційні періоди та пацієнтам зі значним порушенням функцій.

Імунологічне обстеження включало в себе кількісну оцінку різних субпопуляцій лімфоцитів не-

прямим імунофлюоресцентним методом за допомогою моноклональних антитіл виробництва ЗАТ "Сорбент-сервіс" (Москва), а також вивчення цитокінпродукуючої функції імунокомпетентних клітин крові за допомогою визначення продукції ІФН- γ та ФНП- α імуноферментним методом з використанням наборів для ІФА виробництва ТОВ "Протеїновий контур" (Санкт-Петербург, Росія).

Всіх обстежуваних було розподілено в залежності від вираженості неврологічного дефіциту на 4 групи. Ступінь порушень неврологічного статусу оцінювався за шкалами Бартела та чотирьохбальної оцінки в день госпіталізації та кожні 10 днів перебування в стаціонарі. При використанні шкали Бартела, оцінка рівня побутової активності проводилась по сумі балів пацієнта за кожним із розділів тесту. Максимальна сума балів, що відповідає повній незалежності у повсякденному

житті дорівнює 100 балів.

За шкалою чотирьохбальної оцінки вираховується ступінь порушень неврологічного статусу. Виражений ступінь 7-13 балів, помірний - 14-20 балів, легкий - 21-27 балів та 28 балів - порушень немає.

Показники клітинного імунітету у хворих з помірними та вираженими неврологічними порушеннями у відновлювальному періоді не мали між собою вірогідних відмінностей. Для обох цих груп хворих була характерною збережена кількість Т, та, НК-клітин наявний В-лімфоцитоз. В той же час, спостерігалось достовірне зниження імунорегуляторного показника (CD4/CD8 лімфоцити). Для хворих з вираженим неврологічним дефіцитом був характерним високий відсоток CD95⁺ лімфоцитів, що свідчить про підвищену готовність до апоптозу імунокомпетентних клітин.

Таблиця

Вміст популяцій та субпопуляцій лімфоцитів у постінсультних хворих залежно від ступеня неврологічного дефіциту (M \pm m).

показник	Хворі зі ступенем F ₁ (n=9)	Хворі зі ступенем F ₂ (n=17)	Хворі зі ступенем F ₃ (n=14)	Хворі зі ступенем F ₄ (n=8)	Хворі зі ступенем (n=25)
Лейкоцити $\times 10^9/l$	5,8 \pm 0,44	6,23 \pm 0,49	6,13 \pm 0,43	5,97 \pm 0,51	6,96 \pm 0,72
Лімфоцити, %	33,00 \pm 3,2	30,12 \pm 3,5	27,29 \pm 3,1	29,50 \pm 3,2	31,64 \pm 3,89
CD3 ⁺ лімф., %	79,40 \pm 6,2*	65,77 \pm 6,1	65,92 \pm 5,9	64,75 \pm 6,2	64,86 \pm 5,91
CD4 ⁺ лімф., %	37,95 \pm 2,9	34,66 \pm 2,7	31,50 \pm 2,6	32,01 \pm 2,5	32,33 \pm 3,81
CD8 ⁺ лімф., %	24,10 \pm 2,35	22,30 \pm 2,11	26,66 \pm 2,7	25,94 \pm 2,3	21,52 \pm 2,01
CD4/CD8	1,59 \pm 0,16	1,56 \pm 0,16	1,18 \pm 0,13*	1,23 \pm 0,12	1,61 \pm 0,19
CD19 ⁺ лімф., %	3,20 \pm 0,29*	9,46 \pm 0,95	12,19 \pm 1,3*	11,59 \pm 1,3*	7,85 \pm 1,04
CD16 ⁺ лімф., %	8,90 \pm 0,91*	11,85 \pm 1,13*	15,92 \pm 1,12	14,41 \pm 1,13	17,10 \pm 1,95
CD25 ⁺ лімф., %	3,35 \pm 0,34 ^x	9,46 \pm 0,89 ^x	12,19 \pm 1,14	11,59 \pm 1,13	12,30 \pm 1,17
CD54 ⁺ лімф., %	5,20 \pm 0,51 ^x	5,70 \pm 0,49 ^x	6,89 \pm 0,71 ^x	6,29 \pm 0,59 ^x	11,10 \pm 1,65
CD95 ⁺ лімф., %	4,30 \pm 0,39	5,83 \pm 0,55 ^x	7,64 \pm 0,68 ^x	7,23 \pm 0,71 ^x	3,32 \pm 0,34

Примітки: * - вірогідність різниці показника з контрольною групою (p<0,01), n - кількість хворих.

Проведений аналіз літературних джерел та виявлені порушення в клітинній ланці імунітету у хворих з різним ступенем неврологічних порушень, спонукало нас додатково вивчити питання про

функцію імунокомпетентних клітин на основі синтезу про- та протизапальних цитокінів, з метою більш повного обстеження хворих з наслідками ішемічного інсульту.

Таблиця

Вміст у сироватці крові хворих, які перенесли ішемічний інсульт, про- та протизапальних цитокінів залежно від наявності неврологічних порушень (m \pm m)

Показник	Хворі з F1-ступенем (n=9)	Хворі з F2-ступенем (n=17)	Хворі з F3-ступенем (n=14)	Хворі з F4-ступенем (n=8)	Контрольна група (n=25)
ФНП- α , н ² /мл	52,02 \pm 4,7	67,24 \pm 6,8* p2	69,71 \pm 7,1*	94,50 \pm 8,3*	42,31 \pm 4,9
ІЛ-1 β , н ² /мл	45,02 \pm 4,6	62,71 \pm 6,3* p2	68,36 \pm 7,2*	106,88 \pm 10,5* p4	39,42 \pm 4,52
ІЛ-6, н ² /мл	7,0 \pm 0,96	9,65 \pm 1,1	10,93 \pm 1,4	18,25 \pm 2,2* p4	10,31 \pm 2,3
ІЛ-4, н ² /мл	137,02 \pm 9,1*	86,53 \pm 8,9* p2	62,71 \pm 6,4* p3	64,75 \pm 6,6*	25,42 \pm 3,3

Примітки: * - Вірогідність різниці показника з контрольною групою (P₁<0,01)

p2 - вірогідність різниці показника у хворих з F1 і F2

p3 - вірогідність різниці показника у хворих F2 і F3;

p4 - вірогідність різниці показника у хворих з F3 і F4.

В запропонованому способі обстеження використовується поєднання клінічних та імунологічних критеріїв, що сприяє підвищенню інформативності. Даний спосіб значно підвищує ступінь обстеження хворих, і, як результат дозволяє покращити лікування хворих з наслідками ішемічних інсультів. Ефективність методу доведена дослідженнями у відділенні неврології та міському центрі нейрореабілітації КМКЛ №18. Приклади застосування запропонованого способу обстеження наслідків ішемічного інсульту наведені нижче.

Хворий Остапеч М.І., 1950 року народження, поступив в неврологічне відділення КМКЛ №18 з діагнозом ЦВХ: Стан після перенесеного порушення мозкового кровообігу за типом ішемії у вигляді глибокого правостороннього геміпарезу, сенсо-моторної афазії, з порушенням функції ходи та самообслуговування. Ранній реабілітаційний період. Повільний темп поновлення втрачених функцій. За шкалою чотирьохбальної оцінки при поступленні у хворого 12 балів. Хворий отримувал адекватний комплекс відновної терапії, а саме актовегін 5,0 в/в №10, мілдронат 5,0 в/в №10, мільгама 2,0 в/м №10, прозерін 1,0 в/м №10, масаж, ЛФК. За даними нейроімунологічного обстеження у хворого було виявлено такі показники: CD4/CD8-0,43, CD95-10,0%, Інтерлейкін-6-30пг/мл, Інтерлейкін-4-130пг/мл. Незважаючи на повний об'єм відновного лікування стан хворого значно не покращився (при виписці - 13 балів) незважаючи на відносно молодий вік та ранній реабілітаційний період.

Форостяная С.П., 1967р.н., поступила в неврологічне відділення КМКЛ №18 з діагнозом ЦВХ: Стан після перенесеного порушення мозкового кровообігу за типом ішемії у вигляді помірного правостороннього геміпарезу, елементів моторної афазії. Ранній реабілітаційний період. Швидкий темп поновлення втрачених функцій. За шкалою чотирьохбальної оцінки при поступленні у хворого 20 балів. Хвора отримувала адекватний комплекс відновної терапії, а саме актовегін 5,0в/в №10, мілдронат 5,0 в/в №10, мільгама 2,0в/м №10, прозерін 1,0в/м №10, масаж, ЛФК. За даними нейроімунологічного обстеження у хворій було виявлено такі показники: CD4/CD8-2,1, CD95-9,4%, Інтерлейкін-6-6пг/мл, Інтерлейкін-4-180пг/мл. За період

відновного лікування в стаціонарі стан хворій значно покращився (при виписці - 26 балів).

Наведені приклади підтверджують надійність даного способу оцінки цитокіно-імуного статусу хворих з наслідками ішемічного інсульту. Таким чином, запропонований спосіб обстеження за допомогою нейроімунологічного дослідження доцільно проводити хворим з наслідками ішемічного інсульту, особливо зі значним неврологічним дефіцитом, а також хворим молодого працездатного віку з метою визначення необхідності корекції медикаментозної терапії. Даний метод розкриває нові можливості для проведення імунокорегуючої терапії у хворих з наслідками ішемічних інсультів.

Джерела інформації:

1. Зозуля І.С., Боброва В.І. Ішемічний інсульт епідеміологія і шляхи зниження смертності // Мед. новости. - 1998. - №4. - С.7-8.

2. Зозуля І.С., Поліщук Л.А., Синицький С.І. Прогнозування розвитку ішемічного інсульту зі зворотнім та незворотнім дефіцитом // Актуальні проблеми надання екстренної медичної допомоги при невідкладних станах: Матеріали. - К., - 1995. - С.79-80.

3. Гусев Е.И., Скворцова В.И., Изыкенова Г.А. и др. Изучение уровня аутоантител к глутаматным рецепторам в сыворотке крови у больных в остром периоде ишемического инсульта // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. - 1996. - Т.96, №5. - С.68-72.

4. Kostulas N., Pelidou H., Kivisakk P., Kostulas V., Link H. Increased IL-1, IL-8 and IL-17 mRNA expression in Blood Mononuclear cells observed in a prospective ischemic stroke study // Stroke / 1999. - V.30, №10 - P.2174-2179.

5. Лысяный Н.И. и соавторы. Иммунная система головного мозга // Киев: "ВИПОЛ". - 1999. - 216с.

6. Лысяный Н.И. Нейроиммунные взаимоотношения, их значение для неврологи // Український вісник психоневрологи. - Харків. - 1996. - т.№4, вип. 5/12/. - С.423-425.

7. Vila N, Castillo J., Davalos A., Chamorro A. Proinflammatory cytokines and early neurological worsening in ischemic stroke // Stroke. 2000 - V.31, №10, - P.2325-2329.