



УКРАЇНА

(19) UA (11) 19128 (13) U
(51) МПК (2006)
A61B 10/00
G01N 33/49

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) ПРОЦЕС ДІАГНОСТИКИ І ПРОГНОЗУ КЛІНІЧНОГО ПЕРЕБІГУ ПАТОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

1

(21) u200602031

(22) 24.02.2006

(24) 15.12.2006

(46) 15.12.2006, Бюл. №12, 2006р.

(72) Клімова Олена Михайлівна, Божков Анатолій Іванович, Бойко Валерій Володимирович

(73) Клімова Олена Михайлівна

(57) Процес діагностики і прогнозу клінічного перебігу патологічного процесу, що включає внесення в фіксований об'єм сироватки крові хворого зависі синхронізованої культури *Dunaliella viridis*, оцінку змін форми клітин водорості, наявності, кількості і розмірів клітинних агрегатів, а також наявності глікопротеїнової оболонки, утвореної у агрегатів, який **відрізняється** тим, що додатково оцінюють зміну розмірів клітин водорості, форму клітинних мікро- та макроагрегатів, наявність філаментів і

2

включень, спонтанну рухливість клітин водорості, а діагностику здійснюють віднесенням до однієї з форм і стадій патологічних станів - гострих деструктивних процесів, перехідних і стійких станів, при цьому, якщо виявляють втрату рухливості у 30-40% клітин біосенсора, діагностують гострий деструктивний процес; при виявленні втрати рухливості у 45-55% клітин біосенсора, зміні форми у 30-40% клітин біосенсора, при наявності філаментів в агрегатах і формуванні глікопротеїнової оболонки діагностують пухлинні процеси; при виявленні втрати рухливості у 75-80% клітин біосенсора, зміні форми у 80% клітин біосенсора і залученні до утворення макроагрегатів більше, ніж 90% клітин біосенсора, діагностують стійкі незворотні патологічні стани (наприклад, цироз печінки).

Корисна модель відноситься до імунології, а також до медицини перехідних та стійких критичних станів і може бути використана для диференціальної діагностики і прогнозу захворювань шляхом визначення сироваточних цитотоксичних факторів.

При традиційній діагностиці частіш за все фіксують фінал розвитку патологічних станів, але лікування стійких незворотних станів надзвичайно ускладнена. Тому існує невирішена проблема експрес-діагностики різних, в тому числі ранніх, етапів розвитку невідкладних станів. Відомо, що цитотоксичні компоненти, що утворюються в організмі під впливом різноманітних несприятливих ендогенних і екзогенних факторів, можуть призводити до змін в системі регуляції гомеостазу організму. Класифікація станів, що характеризують форму і стадії патології, основана на дискретній стандартизації цих категорій. Задача ранньої діагностики різних форм і стадій захворювань може бути вирішена шляхом виявлення цитотоксичних факторів крові до формування незворотних патологічних процесів.

Стандартні діагностичні лабораторні методи основані на кількісній оцінці сигнальних маркерних

показників в сироватці крові, тобто речовин, зміна вмісту яких в сироватці крові корелює з розвитком тієї чи іншої патології. Сукупність патогенетичних сироваточних факторів, що з'явилися при розвитку різних типів патології викликає мембранотропний цитотоксичний ефект. Діагностична задача для виявлення сигнальних маркерів зводиться до визначення інтегральної біологічної дії цитотоксичних факторів. Інтегральне тестування цитотоксичних компонентів сироватки крові, на різних етапах їх утворення, ефективно вирішується за допомогою різних біодатчиків, так як в біологічній системі відбувається посилення сигналу, який достатньо просто і ефективно реєструється.

Біосенсорні методи визначення сироваточних цитотоксичних компонентів основані на формуванні специфічного сигналу відповіді біодатчика, тобто біологічно чутливої системи, посиленні цього сигналу і простої системної реєстрації. Оскільки біодатчик дає різноманітні реакції відповіді, біосенсиори можуть розглядатись як універсальні реєстратори цитотоксичних сироваточних факторів.

Відомо процес визначення токсичних факторів, а саме фосфорорганічних пестицидів, важких металів, який описано в статті Буднікова Г.К., Єв-

(19) UA (11) 19128 (13) U

тюдін Г.А. "Експрес-тести методи визначення інгібіторів гідролітичних ферментів за допомогою електрохімічних біосенсорів" [Российский химический журнал, 2001. - Т. XLV, №4. - С.86-94]. Він включає внесення в середовище, яке тестується (ґрунти, осади та води) біосенсора і виявлення токсичних факторів по зміні його біохімічного сигналу. Оцінка відгуку біосенсора здійснюється по кількості кислоти, що виділяється в ферментативній реакції гідролізу. Індикація здійснюється за допомогою перетворення біохімічного сигналу в електричні показники. В якості біосенсора використовують іммобілізовані ферменти із класу гідролаз на синтетичних мембранах.

Відомий спосіб визначення рівня токсичних факторів дозволяє здійснювати тестування реальних об'єктів навколишнього середовища, де токсинами є фосфоорганічні пестициди, аміни і іони важких металів. Однак він не може бути застосований для визначення токсичних факторів сироватки крові через низький поріг чутливості даного процесу (такі біосенсиори відрізняються низькою селективністю по відношенню до токсичних факторів і гетерогенністю кінетичних процесів). Іммобілізовані ферменти володіють рядом гетерогенних властивостей, які можуть впливати на зміну електричних показників, в результаті чого не досягається достовірна оцінка плинності і прогнозу захворювання на основі визначення сироваточних цитотоксичних факторів. Даний метод не забезпечує рецепторну комплементарну взаємодію зі всіма цитотоксичними субстратами.

Найбільш близьким до корисної моделі по суті і досягнутому результату є процес визначення цитотоксичних сироваточних факторів, який описано в статті А.І. Божкова, Н.Г. Мензянової, О.М. Клімової "Використання водоростей в якості клітинного біосенсора при оцінці патологічного стану організму" [Матеріали конференції "Горизонти біофізики: від теорії до практики. - Пуціно. - 2003. - С.68-69]. Він включає внесення в зв'язь синхронізованої культури *Dunaliella viridis* фіксованого об'єму сироватки крові хворого, оцінку змін форми клітин водорості, наявності, кількості і розміру клітинних агрегатів, а також наявності глікопротеїнової оболонки, утвореної у агрегатів.

Клітинна тест-система володіє здатністю вибірково експресувати рецептори-домени у відповідь на присутність лігандів різних цитотоксичних факторів сироватки крові. Описаний спосіб дає достатню достовірність, але до його недоліків слід віднести те, що він не дозволяє кількісно оцінити важкість і дати прогноз перебігу захворювання.

В основу корисної моделі поставлено задачу створення удосконаленого способу визначення цитотоксичних сироваточних факторів, що дозволить здійснювати і вибірково якісне та кількісне визначення цитотоксичних факторів сироватки крові, що характеризують різні форми і стадії патологічних станів - гострих деструктивних процесів, перехідних зворотних станів і стійких необоротних процесів - по типам реакції відповіді клітинної тест-системи, при збереженні високої вірогідності оцінки перебігу і прогнозу захворювання.

Для вирішення поставленої задачі в процесі визначення цитотоксичних факторів, що включає внесення в зв'язь синхронізованої культури *Dunaliella viridis* фіксованого об'єму сироватки крові хворого, оцінку змін форми клітин водорості, наявності, кількості і розмірів клітинних агрегатів, а також наявності глікопротеїнової оболонки, утвореної у агрегатів, в відповідності з корисною моделлю додатково оцінюють зміну розмірів клітин водорості, форму клітинних мікро- та макроагрегатів, наявність філаментів і включень, та спонтанну рухливість клітин водорості, а діагностику здійснюють віднесенням до однієї з форм і стадій патологічних станів - гострих деструктивних процесів, перехідних і стійких етапів. При цьому, якщо виявляють втрату рухливості у 30-40% клітин біосенсора і залучення до утворення мікроагрегатів 30-40% клітин біосенсора, діагностують гострий деструктивний процес; при виявленні втрати рухливості 45-55% клітин біосенсора, зміні форми у 30-40% клітин біосенсора і при наявності філаментів в агрегатах і формуванні глікопротеїнової оболонки діагностують пухлинні процеси; при виявленні втрати рухливості 75-80% клітин біосенсора, зміні форми у 80% клітин біосенсора і залученні до утворення макроагрегатів більше 90% клітин біосенсора діагностують стійкі необоротні патологічні стани (наприклад, цироз печінки).

Введення нових діагностичних ознак (зміна спонтанної рухливості клітин водорості, розмірів клітин водорості, форми клітинних мікро- та макроагрегатів, наявність філаментів і включень) спільно з відомими, дозволяє віднести патологію до одного з класів імунофізіологічних порушень (форм і стадій патологічних станів) - гострих деструктивних процесів, перехідних і стійких станів.

Заявнику невідомо введення зазначених діагностичних ознак і є результатом власних досліджень авторів. Ці дослідження показали, що реакція біосенсора є інтегральною і асоційована зі зміною конкретних фізіологічних показників, які є значимими для оцінки важкості, стадії і зворотності патологічних процесів (гострих деструктивних процесів, перехідних і стійких станів): втрата рухливості клітин біосенсора, утворення клітинних мікро- і макроагрегатів, кількість клітин в агрегатах, зміна форми клітин, наявність капсули, філаментів і включень [див. Божков А.І., Клімова О.М., Бойко В.В., Мензянова Н.Г., Дроздова Л.А. Зв'язок клінічних форм міастенії з частотою зустрічальності HLA-DR - фенотипу і розробка клітинного біосенсора для оцінки цієї патології (Доповіді Національної Академії Наук України, 2002 - №3 - С.161-166); В.В. Бойко, О.М. Клімова, А.І. Божков, Л.А. Дроздова, Ю.В. Дмитрієв Використання діагностичних клітинних біосенсорів та лікувальних клітинних трансплантатів при невідкладних хірургічних станах (Харківська хірургічна школа, 2005, №11 - С.222-229)].

Приклад виконання даного способу ілюструється фотографіями, на яких зображено:

Фіг.1 - суспензія культури клітин *Dunaliella viridis* в нормі - контроль;

Фіг.2 - те саме, утворення мікроагрегатів - після впливу цитотоксичних факторів сироватки крові;

Фіг.3 - те саме, утворення макроагрегатів і зміна розмірів клітин - після впливу цитотоксичних факторів сироватки крові;

Фіг.4 - те саме, утворення макроагрегатів і зміна форми клітин - після впливу цитотоксичних факторів сироватки крові;

Фіг.5 - те саме, утворення агрегатів, включень, утворення глікопротеїнової оболонки - після впливу цитотоксичних факторів сироватки.

Суть корисної моделі ілюструється прикладом її конкретного виконання. Спосіб полягає в наступному.

Перший етап визначення цитотоксичних факторів полягає в одержанні синхронізованої культури *Dunaliella viridis*. Наступний етап полягає в спільній інкубації в імунологічному планшеті заданих об'ємів клітинної суспензії *Dunaliella viridis* з певною кінцевою концентрацією клітин і досліджуваної сироватки крові.

Потім проводять візуальну оцінку (за допомогою мікроскопії) реакції відповіді на цитотоксичні фактори біодатчика: оцінку зміни форми і розмірів клітин водорості, наявності, кількості, розмірів і форми клітинних мікро- та макроагрегатів, а також наявності глікопротеїнової оболонки, утвореної у агрегатів, філаментів і включень, спонтанну рухливість клітин водорості.

Діагностику здійснюють віднесенням до однієї з форм і стадій патологічних станів - гострих деструктивних процесів (наприклад, панкреанекроз), перехідних і стійких станів. При виявленні втрати рухливості у 30-40% клітин біосенсора і залучення до утворення мікроагрегатів 30-40% клітин біосенсора діагностують гострий деструктивний процес; при виявленні втрати рухливості 45-55% клітин біосенсора, зміні форми у 30-40% клітин біосенсора і при наявності філаментів в агрегатах і формуванні глікопротеїнової оболонки діагностують пухлинні процеси; при виявленні втрати рухливості 75-80% клітин біосенсора, зміні форми у 80% клітин біосенсора і залученні до утворення макроагрегатів більше ніж 90% клітин біосенсора діагнос-

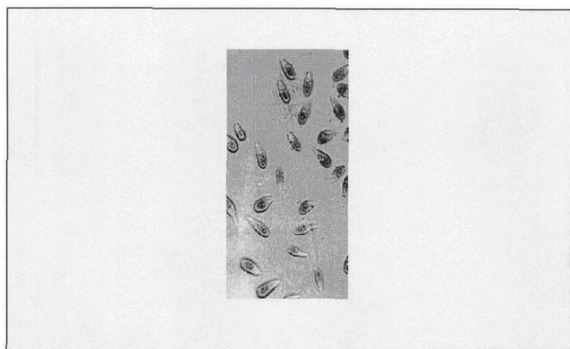
тують стійкі незворотні патологічні стани (наприклад, цироз печінки).

Наступний етап інтегрального тестування полягає в оцінці інтервалів частоти зустрічальності різних параметрів, що характеризують реакції клітинного біосенсора і зіставлення цих характеристик з фотографіями діагностичного протоколу і показниками імунорезистентності.

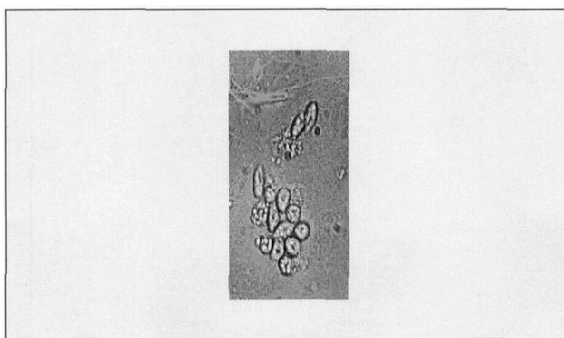
Так, якщо в контрольній культурі все клітини мали природну рухливість (рух здійснюється за допомогою джгутика), то після інкубації клітинної тест-системи водорості з сироваткою хворого з пухлинним ураженням виличкової залози кількість округлих клітин збільшувалась до 80%, а нерухливих - до 60%. Найбільш яскравими змінами в поведінці тест-об'єкта після внесення сироватки хворих з пухлинами тимусу було утворення клітинних мікроагрегатів - до 80% клітин утворювали агрегати. Стійкі незворотні стани і перехідні відрізняються тим, що при незворотних станах максимальна кількість змінює свою форму, а при перехідних станах, велика кількість клітин утворює макроагрегати.

Таким чином, запропонований спосіб дозволяє здійснювати вибірне якісне і кількісне визначення цитотоксичних факторів сироватки крові, що характеризують різні форми і стадії патологічних станів - гострих деструктивних процесів, перехідних зворотних станів і стійких незворотних процесів - по типам реакції відповіді клітинної тест-системи, при збереженні високої вірогідності оцінки перебігу і прогнозу захворювання. Окрім цього, використання даного способу діагностики дозволяє оцінити ефективність дії в процесі лікування захворювання і коректувати його. Діагностична значимість запропонованого метода, окрім експрес-тестування, доповнюється економічною доступністю.

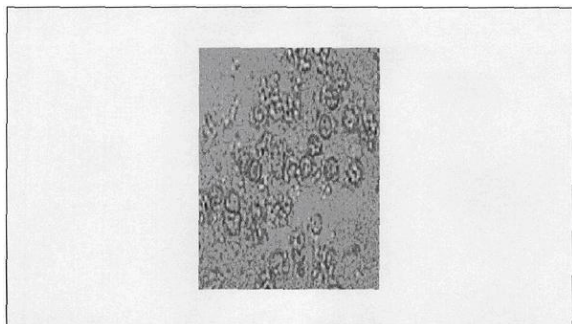
Спосіб дозволяє по характеру реакції відповіді *Dunaliella viridis* судити про різні типи і стадії патологічного процесу і про наявність різноманітності цитотоксичних сироваточних факторів. Спосіб біоіндикації з використанням клітинної тест-системи *Dunaliella viridis* за допомогою світлової мікроскопії є більш вдалим і наочним методом у порівнянні з прототипом.



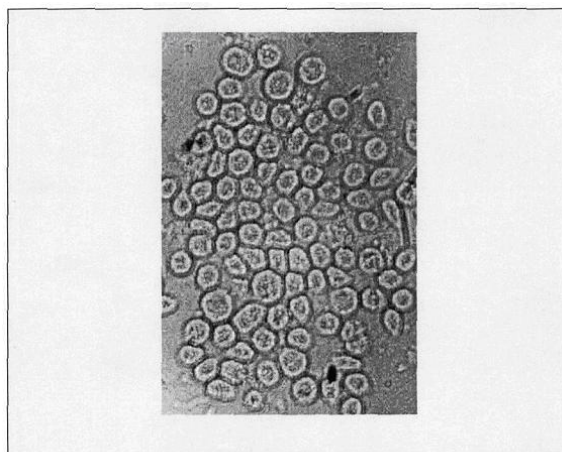
Фіг. 1



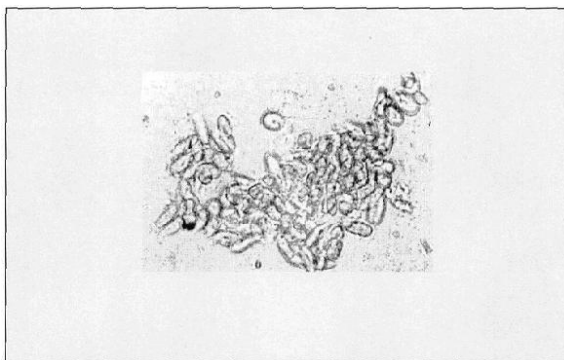
Фіг. 2



Фіг. 3



Фіг. 4



Фіг. 5