



УКРАЇНА

(19) UA (11) 5202 (13) U

(51) 7 G01N33/48

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ РЕЦИДИВІВ НЕСПЕЦИФІЧНОГО ВИРАЗКОВОГО КОЛІТУ

1

2

(21) 20040706354

(22) 30 07 2004

(24) 15 02 2005

(46) 15 02 2005, Бюл. № 2, 2005 р

(72) Сергієнко Олена Іванівна

(73) Харківська медична академія післядипломної освіти

(57) Спосіб прогнозування рецидивів неспецифічного виразкового коліту шляхом визначення показників крові, який відрізняється тим, що у сироватці крові визначають інтерлейкін-1 β і інтерлейкін-4 і при підвищеному значенні інтерлейкіну-1 β більше 50 пг/мл і відсутності значного росту показника інтерлейкіну-4 прогнозують рецидив неспецифічного виразкового коліту

зників крові, який відрізняється тим, що у сироватці крові визначають інтерлейкін-1 β і інтерлейкін-4 і при підвищеному значенні інтерлейкіну-1 β більше 50 пг/мл і відсутності значного росту показника інтерлейкіну-4 прогнозують рецидив неспецифічного виразкового коліту

Корисна модель відноситься до галузі медицини, а саме до гастроентерології, та може бути використана для прогнозування рецидивів неспецифічного виразкового коліту (НВК) як у стаціонарних, так і у амбулаторних умовах

Актуальність корисної моделі пов'язана зі схильністю неспецифічного виразкового коліту (НВК) до рецидивування, прогресування, виникнення ускладнень, що призводить до втрати працездатності і швидкої інвалідизації хворих. Застосування сучасних лікарських засобів дозволяє у більшості хворих купувати загострення хвороби, але ремісія, як правило, носить тимчасовий характер. Серед причин виникнення рецидиву НВК називають відсутність етіотропної терапії, резистентність хворих до препаратів, недостатність (за дозами або часом) проведеного лікування, та інші. У ряді спостережень поліпшення самопочуття і припинення діареї, виділення крові з калом не є ознакою дійсного гальмування запального процесу, який може тривати у слизовій оболонці товстої кишки без явних клінічних ознак і у короткочасний термін проявитися рецидивом захворювання. Тому необхідна розробка інформативних критеріїв для прогнозування перебігу захворювання та вибору адекватної схеми лікування.

Відомий спосіб оцінки стану хворих на НВК (Rachmilewitz D. Coated mesalazine (5-aminosalicylic acid) versus sulphasalazine in the treatment of active ulcerative colitis: a randomized trial//Br med -1989 -Vol 298 -P 82-86) - у підставі якого є вивчення клінічних ознак загострення НВК (болісності у животі, кількості випорожнень, наявності домішок у калі) та окремих лабораторних

ознак. Недоліком цього способу є суб'єктивність оцінки хворим проявів захворювання, спосіб не володіє високою точністю, одержані результати можуть вказувати на стадію загострення НВК, проте для прогнозування рецидивів не є інформативними.

Існує метод діагностики НВК за допомогою визначення аутоантитіл в крові хворих у тесті ANCA (antineutrophil cytoplasmic autoantibodies) (Златкіна А.Р., Белоусова Е.А. Медиаторы воспаления при язвенном колите и болезни Крона. Международ. мед. обзоры -1993 -№5 -С 378-386). Проте аутоантитіла визначаються в середньому у 40-70% хворих на НВК. Позитивний тест визначення аутоантитіл характеризує наявність аутоімунного процесу, є показанням для призначення імуносупресантів, для визначення прогнозу у хворих на НВК цей спосіб є не досить точним.

Найбільш близьким і обраним за прототип є метод оцінки активності НВК, який полягає у визначенні в крові маркера запалення β_2 -мікроглобуліну (Белоусова Е.А., и соавт. Динамика β_2 -микроглобулина у больных язвенным колитом как показатель активности воспаления. В кн. Проблемы гастроэнтерологии -Москва -1995 -С 16-17). Цей спосіб дає змогу оцінити активність захворювання шляхом оцінки ступеню активності лімфоцитів, тому що β_2 -мікроглобулін продукується лімфоцитами. Проте цей спосіб не є специфічним, тому що вміст β_2 -мікроглобуліну змінюється при системних захворюваннях сполученої тканини і для прогнозування рецидиву НВК

(13) U

(11) 5202

(19) UA

спосіб не є досить точним. Між способом-прототипом і способом, що пропонується, є спільні риси - визначення показників крові імунологічним методом.

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалення способу прогнозування рецидивів неспецифічного виразкового коліту, в якому за рахунок зміни досліджуваних показників крові досягається визначення характерних порушень імунного гомеостазу, за рахунок чого підвищується точність прогнозування рецидивів неспецифічного виразкового коліту.

Поставлена задача вирішується в способі визначення активності неспецифічного виразкового коліту шляхом визначення показників крові, згідно з корисною моделлю, у сироватці крові визначають інтерлейкін-1 β і інтерлейкін-4, і при підвищеному значенні інтерлейкіну-1 β більш 50 пг/мл і відсутності істотних змін показника інтерлейкіну-4 прогножують рецидив неспецифічного виразкового коліту.

Патогенез неспецифічного виразкового коліту в даний час розглядають як каскадний процес імуннопатологічних реакцій, формування і регуляція яких здійснюється при участі інтерлейкінів. Інтерлейкіни це білки, які продукуються активізованими імунними клітинами слизової оболонки кишечника, крові, ендотелію судин, які впливають на активність, диференціацію і проліферацію інших клітин і відіграють ведучу роль у регуляції всіх етапів запальної реакції і регенерації слизової товстої кишки при НВК. Головним прозапальним інтерлейкіном є ІЛ-1 β , він є медіатором розвитку як місцевої запальної реакції, так і системної, "гострофазової" відповіді організму. Прозапальний ефект ІЛ-1 β пов'язаний, насамперед, з його здатністю стимулювати синтез білків гострої фази, пірогенних субстанцій, простагландинів, колагену, стимуляцією ендотелію судин. Тому саме високий рівень ІЛ-1 β є відображенням активного запального процесу. Регулятором і активним інгібітором продукції ІЛ-1 β є ІЛ-4.

ІЛ-4 - відноситься до протизапальних інтерлейкінів. Основною функцією ІЛ-4 є контроль проліферації, диференціювання і функцій В-лімфоцитів, тобто антитільної відповіді. ІЛ-4 здійснює контроль регуляції продукції інтерлейкінів прозапальної спрямованості, підсилює диференціювання в цитотоксичні Т-клітини, активує макрофаги, індукуює проліферацію натуральних кілерів. Протизапальний потенціал цього інтерлейкіну заслуговує увагу з огляду на його можливе застосу-

вання у лікуванні.

Саме завдяки своїм біологічним властивостям ІЛ-1 β і ІЛ-4 є факторами, що відображають баланс прозапальні-протизапальні медіатори; переважання синтезу прозапального ІЛ-1 β над протизапальним ІЛ-4 свідчить про дисбаланс регуляції і швидкий рецидив захворювання.

Спосіб, що заявляється, здійснюють таким чином. Кров забирають за допомогою венепункції в суху пробірку. Після згортання і ретракції згустку кров центрифугують при 3000 об/хв. і відокремлюють сироватку, яку використовують для визначення інтерлейкінів. У нормі інтерлейкіни, що утворюються, при первинному антигенному роздратуванні у кровотік не надходять; у сироватці крові можуть бути присутні лише пікограмові кількості інтерлейкінів.

У сироватці крові інтерлейкіни визначали кількісним імуноферментним аналізом за допомогою тест-систем ТОО "Протеїновий контур", Санкт-Петербург, Росія. Спосіб, що пропонується, простий у виконанні і може бути застосований для прогнозування перебігу НВК в любых випадках: тяжкому стані хворих, коли проведення інструментального дослідження є небезпечним, у амбулаторних умовах.

При розробці способу лікування обстежено 40 хворих на НВК, які лікувались на протязі 4 тижнів засобами традиційної терапії (салюфальк та антибактеріальні, бактеріальні, залізовміщуючі, симптоматичні засоби за показаннями).

Хворі були розподілені в залежності від частоти рецидивування на 3 групи: перша група - з частотою рецидивування 1 раз на 2-3 роки (14 хворих), друга (18 хворих) - з рецидивами 1 раз на рік і третя - з частотою рецидивування 2-3 рази на рік (8 хворих).

Показники інтерлейкінів визначали двічі: при надходженні і перед випискою із стаціонару. Контролем служили показники цитокінів, визначені у 16 здорових осіб. Дослідження ІЛ-1 β у хворих на НВК у стадію виражених проявів показало збільшення його рівня у хворих на НВК: середньостатистичний показник 136,25 \pm 23,7 пг/мл за межами коливальності 30-628 пг/мл, контроль 26,58 \pm 2,42 пг/мл ($p < 0,01$). Одночасно спостерігалось збільшення вмісту ІЛ-4 163,45 \pm 19,01 пг/мл, контроль 20,66 \pm 2,35 пг/мл ($p < 0,01$), з розбіжністю показнику від 20 до 568 пг/мл.

Показники ІЛ-1 β і ІЛ-4 у хворих на НВК в стадію загострення в залежності від перебігу захворювання наведені в табл.1.

Таблиця 1

Показники ІЛ-1 β і ІЛ-4 у хворих на НВК в стадію загострення в залежності від перебігу захворювання, М \pm m

Показники	Частота рецидивування захворювання		
	1 раз на 2-3 роки, n=18	1 раз на рік, n=14	2-3 рази на рік, n=8
ІЛ-1 β , пг/мл	186 \pm 39,39***	106,07 \pm 41,39*	77,13 \pm 9,22**
ІЛ-4, пг/мл	262,57 \pm 36,81***	136,57 \pm 12,42***	47,43 \pm 7,51*

- розходження достовірні при порівнянні з показником контрольної групи, $p < 0,05$; **- $p < 0,01$; ***- $p < 0,001$.

У першій групі у порівнянні з контролем спостерігався найбільш виражений ріст ІЛ-1 β і ІЛ-4, співвідношення ІЛ-1 β /ІЛ-4 складало 0,7. В другій групі спостерігалось вірогідне зростання прозапального ІЛ-1 β і значне зростання рівня протизапального ІЛ-4 (таблиця 1), завдяки чому ІЛ-1 β /ІЛ-4 дорівнювало 0,78. Найбільш несприятливими є зміни в групі з частотою рецидивування 2-3 рази на рік, де спостерігається достовірне, але менш виражене підвищення ІЛ-1 β при відсутності значного росту протизапального ІЛ-4 (таблиця 1), співвідношення ІЛ-1 β /ІЛ-4 дорівнювало 1,64. Зміни в третій групі мо-

жуть служити критерієм рецидиву НБК.

Аналіз показників ІЛ-1 β і ІЛ-4 у хворих на НБК після лікування підтвердив їх прямий зв'язок із частотою рецидивування НБК і значущість визначення цих факторів як критеріїв прогнозу рецидивування захворювання. Так, у хворих із рецидивуванням 2-3 рази на рік співвідношення прозапальні-протизапальні інтерлейкіни складало 3,3, в той час як при рідких загостреннях хвороби - 0,7. Показники ІЛ-1 β і ІЛ-4 у хворих на НБК після лікування в залежності від перебігу захворювання наведені в табл. 2.

Таблиця 2

Показники ІЛ-1 β і ІЛ-4 у хворих на НБК після лікування в залежності від перебігу захворювання, M+m

Показники	Частота рецидивування захворювання		
	1 раз на 2-3 роки, n=18	1 раз на рік, n=14	2-3 рази на рік, n=8
ІЛ-1 β , пг/мл	26,89 \pm 2,15	32,93 \pm 1,8*	62,87 \pm 6,56**
ІЛ-4, пг/мл	38,5 \pm 2,48**	28,79 \pm 1,3*	19 \pm 1,05*

- розходження достовірні при порівнянні з показником контрольної групи, p<0,05, **-p<0,01, ***-p<0,001

Приклад 1

Виписка з історії хвороби №3082 хворої Ч., 1962р.н., що знаходилася на лікуванні в гастроентерологічному відділенні Миської клінічної лікарні №2 м. Харків з 19.05.03 по 13.06.03.

Скарги на рідкий стілець із домішком слизу і прожилками крові 6 разів на добу, болі у низу живота до та після дефекації, слабкість, дратівливість, зменшення апетиту, буває підвищення температури тіла до 37,2. Хворіє з 1999 року, щорічно лікується стаціонарно, буває два рази на рік. Поступила до відділення гастроентерології у зв'язку з загостренням захворювання.

Об'єктивно: Шкіра бліда, чиста. Периферичні лімфатичні вузли по 1,0 см, рухомі. У легенях дихання везикулярне. Серце - діяльність ритмічна, тони помірно приглушені. ЧСС=80 в 1 хвилину. Пульс 80 уд/хв, задовільних якостей, АТ 100/60 мм рт.ст. Язик вологий, обкладений білим нальотом. Живіт м'який, помірно здутий по периферії, при пальпації болючий по ходу товстої кишки. Печінка у края реберної дуги, селезінка не пальпується.

Дані лабораторних досліджень

Аналіз крові клінічний: Ер-3,7 10^{12} /л, Нb-109 г/л, Л-5,0 10^9 /л, п-10, с-50, п-30, м-6, е-4, ШЗЕ-5 мм/год. Аналіз сечі: уд. вага-1008, сахар, білок не знайдені, л 1-2 екз у п/з, ер-одичинні. Копрограма - крахмал - небагато, еритроцити-10-12 у полі зору.

Загальний білок-60 г/л, тимолова проба-0,6 од., л-ліпопротеїди-60 од., лужна фосфатаза-3 од., амілаза-24, білірубін загальн.-10, прям.-1, непряма-9.

Згідно способу-прототипу β_2 -мікроглобулін-26 мг/мл (контроль 8 \pm 3,4 мг/мл), згідно способу, що пропонується ІЛ-1 β =340 пг/мл, ІЛ-4 38 пг/мл. Отримані результати свідчать про високу активність загострення захворювання у цієї хворої, - перевагу

синтезу прозапального медіатора над протизапальним, - що вказує на несприятливий перебіг захворювання.

Дані інструментальних досліджень

Ендоскопічні дані при госпіталізації (ректороманоскопія) на протязі 15 см від анусу набряк, попереми слизової оболонки товстої кишки, відсутність судинного малюнку, контактна кровоточивість, далі провести тубус не вдається із-за контактної кровотечі. На глибини 9, 10, 11, 12 часів-поліпи слизової-коагульовані. При гістологічному дослідженні - зменшення келихоподібних клітин у поверхневому епітелії, ознаки дистрофії епітеліального шару, наявність сегментоядерних лейкоцитів у складі інфільтрату власної пластинки слизової оболонки товстої кишки.

Клінічний діагноз: Неспецифічний виразковий коліт в стадії загострення, з переважним ураженням прямої кишки, перебіг середньої важкості, стадія загострення. Анемія. Псевдополіпоз.

Хворій призначено лікування: салюфальк 0,5-4 рази на добу усередину та салюфальк-свчки 0,5-2, мезим-форте, актиферін, інфузійна терапія.

Після чотирьох тижнів лікування кількість випорожнень зменшилась до 1-3 на добу, зникли астеничні і больові прояви. Домішок крові у калі спостерігався не при кожній дефекації. На 5 тижнів лікування проведено визначення показників крові згідно способу-прототипу та запропонованому способу згідно способу-прототипу β_2 -мікроглобулін-12 мг/мл (контроль 8 \pm 3,4 мг/мл), згідно способу, що пропонується ІЛ-1 β =74 пг/мл, ІЛ-4 19 пг/мл. Отримані результати показали збереження інтерлейкінового дисбалансу після лікування, що вказувало на загрозу швидкого рецидиву і було вирішальним при призначенні кортикостероїдних препаратів і подальшого активного спостереження і лікування.

Таким чином, використання запропонованого способу прогнозування НВК у цієї хворої забезпечило призначення адекватного лікування і дозволило уникнути загострення НВК на протязі року

Приклад 2

Виписка з історії хвороби №1972 хворого Х, 37 років, що знаходився на лікуванні в гастроентерологічному відділенні Міської клінічної лікарні №2 м Харків з 28 03 03 по 24 04 03

Скарги на рідкий стілець із домішкою слизу і прожилками крові 3-4 разів на добу, загальну слабкість, дратівливість, зменшення апетиту, буває підвищення температури тіла до 37,2. Хворіє протягом 2 місяців, лікувався амбулаторно. Поступив до відділення гастроентерології у зв'язку з відсутністю ефекту від амбулаторного лікування

Об'єктивно Шкіра бліда, чиста. Периферичні лімфатичні вузли не визначаються. У легенях дихання везикулярне. Серце - діяльність ритмічна, тони помірно приглушені ЧСС=78 в 1 хвилину. Пульс 78 уд/хв, задовільних якостей, АТ 120/70 мм рт.ст. Язик вологий, обкладений білим нальотом. Живіт м'який, помірно здутий по периферії, при пальпації болючий по ходу товстої кишки. Печінка у края реберної дуги, селезінка не пальпується

Дані лабораторних досліджень

Аналіз крові клінічний Ер-4,4 $10^{12}/л$, Нб-146 г/л, Л-4,4 $10^9/л$, п-2, с-64, л-27, м-7, е-3, ШЗЕ-19 мм/год. Аналіз сечі без особливостей. Копрограма - крахмал - небагато, лейкоцити, еритроцити - на 1/2 поля зору

Згідно способу-прототипу β_2 -мікроглобулін-20 г/мл (контроль $8 \pm 3,4$ мг/мл), згідно способу, що пропонується ІЛ-1 β =140 пг/мл, ІЛ-4 160 пг/мл. Отримані результати свідчать про активність загострення захворювання і активний синтез протизапального ІЛ-4, що вказує на високу реактивність імунної системи у цього хворого

Дані інструментальних досліджень

Ендоскопічні дані (ректороманоскопія) на протязі 17 см від анусу набряк, гіперемія слизової оболонки товстої кишки, відсутність судинного малюнку, контактна кровоточивість, "гострі" виразки, одиничні ерозії, вкриті фібрином

Клінічний діагноз Неспецифічний виразковий коліт в стадії загострення, з переважним ураженням прямої кишки, вперше визначений, стадія загострення

Було призначено лікування салюфальк 0,5-4 рази на добу усередину та у свічках по 0,5-2 рази на добу, поліферментні препарати. Під впливом запропонованого курсу лікування загальний стан та самопочуття хворого суттєво покращилися, через 3 тижні з початку лікування спостерігалася клінічна ремісія

Згідно способу-прототипу β_2 -мікроглобулін-10 мг/мл (контроль $8 \pm 3,4$ мг/мл), згідно способу, що пропонується ІЛ-1 β =28 пг/мл, ІЛ-4 38 пг/мл. На підставі отриманих результатів встановлена добра ефективність проведеного лікування, хворому було призначено поступове зниження дози салюфальку з його подальшою відміною. При спостереженні за хворим на протязі року загострення НВК не спостерігалось

Таким чином, використання запропонованого способу у цього хворого дозволило об'єктивно оцінити стан імунної системи, провести необхідне і достатнє лікування, уникнути зайвого прийому ліків

Таким чином, у хворих із часто рецидивуючим НВК в період загострення відзначається порушення інтерлейкинової регуляції, що призводить до порушення імунологічного гомеостазу і зниження резистентності організму в цілому. Визначення підвищеного синтезу прозапального ІЛ-1 β при відсутності вірогідного росту протизапального ІЛ-4 може служити критерієм рецидиву неспецифічного виразкового коліту

Запропонований спосіб прогнозування рецидивів неспецифічного виразкового коліту є простим і доступним, не потребує багато часу для виконання, може бути використаний як у стаціонарних, так і в амбулаторних умовах, у порівнянні із способом-прототипом запропонований спосіб має перевагу завдяки більшій чутливості і чітким кількісним критеріям прогнозування рецидивів захворювання