



УКРАЇНА

(19) UA (11) 57218 (13) U
(51) МПК
G01N 33/68 (2011.01)МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ СТУПЕНЯ ТЯЖКОСТІ НАСЛІДКІВ ПЕРЕНЕСЕНОГО ГОСТРОГО ПОРУШЕННЯ МОЗКОВОГО КРОВООБІГУ ЗА ІШЕМІЧНИМ ТИПОМ

1

2

(21) u201012360

(22) 20.10.2010

(24) 10.02.2011

(46) 10.02.2011, Бюл.№ 3, 2011 р.

(72) БИЧКОВА НІНА ГРИГОРІВНА, ГИЧКА СЕРГІЙ ГРИГОРОВИЧ, БИЧКОВ ОЛЕГ АНАТОЛІЙОВИЧ, СЕРЕДА ПЕТРО ІВАНОВИЧ, ПЕТРИЧЕНКО ВАДИМ ГЕННАДІЙОВИЧ

(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ О.О.БОГОМОЛЬЦЯ

(57) Спосіб оцінки ступеня тяжкості наслідків перенесеного гострого порушення мозкового кровообігу за ішемічним типом, що включає дослідження крові, який **відрізняється** тим, що в сироватці крові

визначають концентрацію циркулюючих імунних комплексів великого, середнього та малого розмірів на спектрофотометрі при довжині хвилі 450 нм, отримані результати виражають в умовних одиницях за формулою:

$$ЦІК = (E_1 - E_0) \times 1000$$
, де

ЦІК - циркулюючі імунні комплекси;

E₁ - дослід одиниць екстинкції;E₀ - контроль, одиниць екстинкції

і, при зниженні концентрації ЦІК великого розміру та збільшенні рівня ЦІК середнього та малого розмірів, оцінюють ступінь тяжкості наслідків перенесеного гострого порушення мозкового кровообігу за ішемічним типом.

Корисна модель, що заявляється, відноситься до галузі медицини, зокрема до терапії та неврології і призначена для оцінки ступеня тяжкості наслідків перенесеного гострого порушення мозкового кровообігу (ГПМК) за ішемічним типом.

Цереброваскулярні розлади (ЦВР) представляють собою найбільш розповсюджену патологію, яка займає третє місце в структурі загальної смертності після серцево-судинних та онкологічних захворювань. Значну частину серед ЦВР займають мозкові інсульти, щорічно вражаючи від 5,6 до 7,0 млн та забираючи життя 4,6 млн людей на планеті. Також актуальна ця проблема і в Україні, де щорічно фіксується 110-130 тисяч інсультів з їх негативними наслідками, що призводить до професійної, соціальної та побутової дезадаптації населення [1-6]. Дослідженнями останнього часу встановлено 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 порушень функцій імунної системи, розвитку аутоімунних реакцій до

антигенів мозку і, таким чином, впливати на розвиток ішемічного інсульту.

Однією з причин тяжкого перебігу наслідків мозкового інсульту є порушення стану імунної системи, які характеризуються підвищеним рівнем прозапальних цитокінів, таких як інтерлейкін ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ-1, ІЛ-2, ФНП-α, С-реактивний протеїн (СРП) та протизапального ІЛ-4, підвищеним рівнем молекул адгезії, які впливають на стан мікроциркуляції, периферичну та каротидну гемодинаміку, сприяють погіршенню перебігу та виникненню ускладнень з розвитком вторинної імунної недостатності, яка супроводжувалась дисбалансом імунорегуляторних субпопуляцій зі зниженням співвідношення CD4⁺/CD8⁺ клітин по мірі поглиблення імунних порушень, зниженням вмісту натуральних кілерних клітин та наявному В-лімфоцитозі. Порушення поглинальної та переварюючої функції нейтрофілів за нашими даними сприяє підвищеному утворенню ЦІК та порушенню їх елімінації. Останні в залежності від їх розміру та активності фагоцитарної системи пацієнта можуть або знаходитись в циркуляції, або фіксуватись у тканинах ендотелію судин, а при приєднанні до антитіл (Ig M та Ig G), що входять до складу ЦІК, комплемента, викликати його активацію і, таким чином, сприяти запуску пошкоджуючого патологічного процесу, активність якого значно зростає при

(19) UA (11) 57218 (13) U

порушенні елімінації ЦІК із організму в результаті зниження фагоцитарної активності нейтрофілів та блокування патогенними ЦІК CD 2 та CD 3 рецепторів на Т- лімфоцитах.

Найбільшу пошкоджуючу дію виявляють патогенні ЦІК середнього (середньомолекулярні з константою седиментації 11-19 S) та малого (дрібномолекулярні з константою седиментації < 11 S) розміру, які утворюються при надлишку антигену та характеризуються тривалою циркуляцією та високою комплементактивуючою здатністю.

Існуючі на даний час способи діагностики не можуть повною мірою достовірно оцінити ступінь тяжкості перебігу наслідків ішемічного інсульту.

Відомий спосіб оцінки цитокино-імунного статусу у хворих з наслідками ішемічного інсульту, обраний нами в якості прототипу, що передбачає дослідження крові, а саме визначення показників CD3, CD4, CD8, CD 19, CD16, CD54, CD25, CD95 та рівні фактора 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 CD95 лімфоцитів 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 цитокино-імунного статусу [7].

Даний спосіб дозволяє оцінити стан імунної системи та цитокиновий статус у хворих з наслідками ГПМК за ішемічним типом, проте дане дослідження є, по-перше, надзвичайно витратним, в зв'язку із значною вартістю як самих моноклональних антитіл, так і наборів для визначення цитокінів (набір для визначення одного цитокіна коштує від 3400 гривень), а, по-друге, займає тривалий час, оскільки набір для визначення кожного цитокіну розрахований на проведення дослідження у 90 хворих, що передбачає збирання сироваток крові у даної кількості пацієнтів протягом тривалого часу.

Задача, яку вирішує корисна модель, що заявляється, полягає у створенні ефективного способу оцінки ступеня тяжкості наслідків перенесеного ГПМК за ішемічним типом, який би дозволив чітко диференціювати ступінь тяжкості наслідків інсульту, був точним, інформативним, більш простим у виконанні, швидким у плані проведення дослідження, не потребував значних коштів на реактиви та дозволив отримати достовірні дані, які б сприяли адекватній та достовірній оцінці ступеню тяжкості патології.

Технічний результат, що досягається корисною моделлю у запропонованому способі, на відміну від прототипу, наведеного вище, полягає у дослідженні в сироватці крові кількості циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) різного молекулярного розміру із визначенням вмісту найбільш пато-

генних ЦІК середнього та малого розміру, які мають значення в перебігу наслідків інсульту.

Даний спосіб дозволить чітко диференціювати ступінь тяжкості наслідків перенесеного ГПМК за ішемічним типом, є точним, інформативним, більш простим у виконанні, швидким у плані проведення дослідження, не потребує значних коштів на реактиви та дозволяє отримати достовірні дані, які сприяють адекватній та достовірній оцінці ступеню тяжкості патології, дозволяє вчасно призначити хворому необхідний курс лікування, враховуючи ступінь тяжкості захворювання.

Поставлена задача вирішується тим, що у відомому способі, що передбачає дослідження крові, згідно корисної моделі, в сироватці крові визначають концентрацію та розмір циркулюючих імунних комплексів на спектрофотометрі при довжині хвилі 450 нм, отримані результати виражають в умовних одиницях за формулою:

$$\text{ЦІК} = (E_1 - E_0) \times 1000, \text{ де}$$

ЦІК - циркулюючі імунні комплекси; E_1 - дослід, одиниць екстинкції; E_0 - контроль, одиниць екстинкції;

і при зниженні концентрації ЦІК великого розміру та збільшенні кількості ЦІК середнього та малого розміру оцінюють ступінь тяжкості наслідків перенесеного гострого порушення мозкового кровообігу за ішемічним типом.

Відмінною особливістю способу, що заявляється, є використання в якості маркера ступеня тяжкості перебігу захворювання концентрації циркулюючих імунних комплексів з різною молекулярною масою, які мають патогенетичне значення в перебігу ГПМК за ішемічним типом, дисбаланс яких в сторону переваги патогенних середньо- та дрібномолекулярних при дефіциті фізіологічних великомолекулярних призводить до наростання тяжкості перебігу захворювання.

Спосіб визначення ступеня тяжкості наслідків перенесеного ГПМК за ішемічним типом, що заявляється, здійснюється наступним чином.

Для проведення дослідження у хворого беруть кров (венозну або капілярну) в кількості 2 мл. Кров центрифугують при 1500 об/хв протягом 10 хвилин і після цього - знімають сироватку крові. Досліджувану сироватку розливають в 1, 2, 3 та 4 пробірки, як зображено на схемі. Для дослідження готують боратний буфер з рН = 8,4; для чого до 55мл 1,24 % розчину борної кислоти додають 45мл 1,9 % розчину бури і доводять об'єм до 1л. На основі боратного буфера готують 2,5 %, 3,75 % та 7,0 % розчини поліетиленгліколю (ПЕГ) - 6000. За допомогою 2,5 % розчину ПЕГ визначають концентрацію великомолекулярних ЦІК, 3,75 % - середньомолекулярних, 7,0 % - дрібномолекулярних. Після приготування розчинів їх послідовно додають до сироватки крові в кількості, як зображено на схемі [8].

Схема постановки:

I пробірка	II пробірка	III пробірка	IV пробірка
Контроль	Дослідні		
0,1мл сироватки + 2,9мл боратного буфера	0,1 мл сироватки +0,2мл боратного буфера + 2,7мл ПЕГ 2,5 % розчину	0,1 мл сироватки +0,2мл боратного буфера + 2,7мл ПЕГ 3,75 % розчину	0,1 мл сироватки +0,2мл боратного буфера + 2,7мл ПЕГ 7,0 % розчину

Після внесення до пробірок всіх інгредієнтів вміст перемішують. Проби інкубують 1 годину при кімнатній температурі, після чого проводять визначення концентрації ЦІК на спектрофотометрі при довжині хвилі 450 нм у кюветі 1×1 см³ за оптичною густиною відповідних зразків. Отриманий на спектрофотометрі результат відповідає концентрації ЦІК в одиницях екстинкції, а після його множення на тисячу - отримують кількість ЦІК в умовних одиницях в 100 мл сироватки крові за формулою:

$$\text{ЦІК} = (E_1 - E_0) \times 1000, \text{ де } E_1 - \text{дослід, } E_0 - \text{контроль.}$$

Статистична обробка отриманих результатів виконана на персональному комп'ютері з викорис-

танням пакету прикладних програм Microsoft XP "Excel".

По запропонованому способу було обстежено 50 хворих, які перенесли ГПМК за ішемічним типом, і отримані результати виявили високу інформативність запропонованого способу в порівнянні зі способом-прототипом (табл. 1). Контрольну групу склали 25 здорових осіб, співставлюваних за віком та статтю. Обстежені хворі із наслідками перенесеного ГПМК за ішемічним типом були розподілені на 4 підгрупи за ступенем неврологічних порушень. Так, ступінь F1 передбачає відсутність неврологічних розладів, F2 - наявність легких неврологічних розладів, F3 - помірних та F4 - виражених порушень неврологічного статусу.

Таблиця 1

Концентрація ЦІК у хворих із наслідками ішемічного інсульту в залежності від ступеня неврологічних розладів (M + m, n=50)

Досліджувані параметри	Хворі із ступенем F1 (n=4)	Хворі із ступенем F2 (n=20)	Хворі із ступенем F3 (n=10)	Хворі із ступенем F4 (n=16)	Контрольна група (n=25)
ЦІК великого розміру, ум. од	36,41±0,71*	29,57±0,32*	20,68±0,51*	15,94±0,54*	51,70±3,17
ЦІК середнього розміру, ум. од	45,92±0,93*	56,41±1,07*	78,39±1,12*	93,79±1,91*	34,54±2,02
ЦІК малого розміру, ум.од	21,43±0,56*	38,97±0,74*	49,37±0,84*	58,64±1,07*	10,94±1,13

Примітка: * - p < 0,05 - достовірність різниці показників відносно даних здорових осіб.

Отримані результати дослідження концентрації ЦІК різного молекулярного розміру співпали зі ступенем тяжкості наслідків ГПМК, коли зростання тяжкості захворювання супроводжувалося підвищенням рівня патогенних ЦІК середнього та малого розміру. Так, легкий перебіг перенесеного ГПМК характеризувався відсутністю неврологічних розладів (ступінь F1), при цьому рівень ЦІК великого розміру був в межах 36,41 ± 0,71 ум.од. і вище, патогенних ЦІК середнього та малого розміру не перевищував 45,92 ± 0,93 ум.од. та 21,43 ± 0,56 ум.од. відповідно. За наявності легких розладів неврологічного статусу (ступінь F2) рівень фізіологічних ЦІК великого розміру був в межах від 29,57 ± 0,32 ум.од., а патогенних ЦІК середнього та малого розміру відповідно від 56,41 ± 1,07 ум.од. та від 38,97 ± 0,74 ум.од. Для важкого ступеня тяжкості наслідків ішемічного інсульту із неврологічними порушеннями помірного (ступінь F3) та вираженого (ступінь F4) прояву характерним був рівень фізіологічних великомолекулярних ЦІК в межах від 78,39 ± 1,12 ум.од. (ступінь F3) до

15,94 ± 0,54 ум.од. (ступінь F4) та нижче; патогенних середньомолекулярних - від 93,79 ± 1,91 ум.од. (ступінь F3) до 58,64 ± 1,07 ум.од. (ступінь F4) та вище.

Перевагою запропонованого способу є те, що він дозволяє чітко диференціювати ступінь тяжкості наслідків перенесеного ГПМК за ішемічним типом, є точним, інформативним, більш простим у виконанні, швидким у плані проведення дослідження, не потребує значних коштів на реактиви та дозволяє отримати достовірні дані, які сприяють адекватній та достовірній оцінці ступеню тяжкості патології, дозволяє вчасно призначити хворому необхідний курс лікування, враховуючи ступінь тяжкості захворювання.

Джерела інформації:

1. Топчий Н.В. Возможности врача общей практики в профилактике и лечении цереброваскулярных расстройств /Н.В. Топчий, Б.Л. Мовшович, Н.В. Денисова //Рус. Мед. Журн. - 2006.- Т. 14, № 29.- С. 2069-2074.

2. Поливода С.Н. Поражение органов-мишеней при гипертонической болезни: Практическое руководство /С.Н. Поливода, Ю.М. Колесник, А.А. Черепок.- К.: Четверта хвиля, 2005.- 800с.

3. Міщенко Т.С. Сучасна діагностика і лікування в неврології та психіатрії. Довідник лікаря /Т.С. Міщенко, В.С. Підкоритов.- К.: ТОВ «Доктор Медіа», 2008. - 624с.

4. Маркин С.П. Современный подход к диагностике и лечению хронической ишемии /С.П. Маркин. //Рус. Мед. Журн. - 2010.- Т. 18, № 8.- С. 445-450.

5. Зозуля І.С. Гострий період ішемічного інсульту: сучасний погляд на проблему /І.С. Зозуля, О.П. Мошенська //Укр. мед. Часопис. - 2009.-№4 (72).-С 67-73.

6. Завгородняя А.Н. Эндотелиальные механизмы патогенеза цереброваскулярной патологии /А.Н. Завгородняя, В.А. Малахов //Укр. мед. Часопис. - 2006.- № 2 (52).- С 32-39.

7. Патент № 12249, G01N33/48, A61B5/1455. Спосіб оцінки цитокіно-імуного статусу у хворих з наслідками ішемічного інсульту /Бровченко М.С., Цимбалюк В.І.; заявник та патентовласник Національний медичний університет імені О.О. Богомольця № U200509780; заявл. 18.10.2005; опубл. 16.01.2006, Бюл. № , 2006.- 8с.

8. Simple method of circulating immune complex detection in human sera by polyethylenglycol precipitation /V. Haskova, J. Kastik, L. Riha [et al.] //Immunol. Forsch. - 1977. -Bd. - 154. - №4. -P. 399-486.