



УКРАЇНА

(19) UA (11) 57714 (13) U
(51) МПК (2011.01)
A61B 10/00
G01N 33/50 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ ПЕРЕБІГУ РЕВМАТОЇДНОГО АРТРИТУ

1

(21) u201009838

(22) 09.08.2010

(24) 10.03.2011

(46) 10.03.2011, Бюл.№ 5, 2011 р.

(72) КУЗЬМІНА ГАННА ПЕТРІВНА, МАРКОВА
ОЛЕНА ЯКІВНА

(73) КУЗЬМІНА ГАННА ПЕТРІВНА, МАРКОВА
ОЛЕНА ЯКІВНА

(57) Спосіб прогнозування перебігу ревматоїдного артриту, що включає відбір проби крові, як біологічного матеріалу, біохімічне та імунологічне дослідження сироватки, визначення в ній концентрацій прогностичних маркерів, розрахунок коефіцієнта та прогнозування за його величиною, який **відрізняється** тим, що додатково як прогностичні маркери залучають ІЛ-6, анти-MCV, як антитіло до

2

цитрулінованого білка віментину, й феритин, і прогнозують наявність певного цитокін-медійованого анемічного синдрому або прогнозованого цитокін-медійованого анемічного синдрому, або відсутність анемії, якщо значення прогностичного коефіцієнта сягає $< 1,00$ або $1,00-2,50$, або $> 2,50$, відповідно, за умови, що прогностичний коефіцієнт розраховують на основі рівняння:

$P_k = \text{ІЛ-6} : \text{Анти-MCV} \cdot \text{Феритин}$, де

P_k - прогностичний коефіцієнт, ум. од.;

ІЛ-6 - концентрація сироваткового інтерлейкіну-6, пг/мл;

Анти-MCV - концентрація антитіла до цитрулінованого білка віментину, U/ml;

Феритин - концентрація феритину, нг/мл.

Корисна модель відноситься до вимірів, зокрема, до дослідження або аналізу матеріалів, переважно, біологічних, наприклад, крові й може бути використаною в медичній практиці, здебільшого, у клініці внутрішніх хвороб (ревматології), як засіб моніторингу.

З науково-технічних повідомлень відомо, що лабораторні тести клінічної картини ревматоїдного процесу, які ґрунтуються на дослідженні рівнів ревматоїдного фактора, С-реактивного білка, концентрацій $\alpha 2$ - і γ -глобулінів, фібриногену, серомукоїдів, антипірину, на аналізі ступеня виразності анемічного синдрому, тромбоцитозу, є найбільш поширеними в техніці даного напрямку [1]. Однак, специфічність і відсутність прийнятної кореляції вищенаведених показників з плином ревматоїдного артриту (РА), а інколи й нестача кількісних характеристик, запобігають можливість одержання достовірних прогнозів під час вибору препаратів для базисної терапії.

Відомий спосіб прогнозування плину ревматоїдного артриту шляхом дослідження біологічного матеріалу, що включає відбір проби слини та визначення в ній вмісту антипірину, де при збільшенні періоду його напіввиведення та зниженні кліренсу монооксигеназної системи, відносно контролю, прогнозують збільшення важкості плину

ревматоїдного артриту [2]. За цим встановлюють порушення біотрансформації антипірину, а відтак порушення монооксигеназної системи, як центральної ланки метаболізму ксенобіотиків і широкого спектра ендогенних з'єднань, уповільнення елімінації біологічно активних речовин, ендогенних субстратів, у т.ч. й зміну фармакокінетичної активності застосовуваних препаратів. Недоліком запропонованого тесту є замала інформативність, наприклад, неможливість визначати подальший плін захворювання, коректувати лікування хворих і оцінювати ефективність терапії РА на тлі анемічного синдрому.

Інший відомий спосіб оцінки ефективності протизапальної терапії ревматоїдного артриту включає відбір проби крові, як біологічного матеріалу, та визначення в ній концентрації β -ендорфіну, до болючого навантаження і на 1-2 хвил після нього, у відповідності з котрим, обраний курс терапії визначають ефективним, якщо відношення кількостей β -ендорфіну після і до болючого навантажень менше 1,20 [3]. Недоліком аналогу, як і у попередньому випадку, є недостатня інформативність, здебільше, з-поза недостатньої кількості оцінних критеріїв і відсутності умов інтерпретації ними. Його додатковим недоліком є використання болю-

UA (11) 57714 (13) U

чого навантаження, яке не завжди показане хворим, особливо, на тлі анемічного синдрому.

Також відомий спосіб діагностики активності ревматоїдного артриту по ступені зниження супресорної функції лімфоцитів, що дозволяє визначати варіанти плинину РА: помірковано знижену супресорну функцію, відповідальну за процеси активації ядерного хроматину в популяції У-клітин, більш характерну для сприятливих перебігів РА, або виражене зниження супресорної функції, сполученої, переважно, з високою вихідною активністю ядерного хроматину в популяції У-клітин, притаманну важкому плинину РА [4]. Позитив наведеної методики полягає у збільшенні інформативності за рахунок кваліфікації варіантів плинину РА, а також у виключенні больового навантаження на людину. Але, отримуваний результат не є вагомим, оскільки встановлювані варіанти плинину РА кваліфікують лише активність поточного процесу, що унеможливорює визначення подальшого плинину захворювання, коректування лікувальної тактики та оцінку ефективності терапії РА на тлі анемічного синдрому. Натомість, недостатня кількість : оцінних критеріїв, запобігає можливість одержання достовірних прогнозів у виборі препаратів базисної терапії.

Більш наближеним до дійсної корисної моделі серед об'єктів аналогічного призначення за кількістю істотних ознак є спосіб прогнозування плинину ревматоїдного артриту, що включає відбір проби крові, як біологічного матеріалу, біохімічне та імунологічне дослідження сироватки, визначення в ній концентрації прогностичних маркерів, розрахунок коефіцієнта та прогнозування за його величиною, у відповідності з котрим, як прогностичні маркери залучають інтерлейкін-1 і показник загальної антиоксидантної активності сироватки крові, та встановлюють за величиною коефіцієнта прогресування несприятливий або сприятливий плин ревматоїдного артриту, при його значеннях більше або менше 12,9, відповідно, за умови, що коефіцієнт прогресування ревматоїдного артриту розраховують за формулою:

$K_1 = \text{ІЛ-1} : \text{АОА}$, де

P_k - коефіцієнт прогресування ревматоїдного артриту, ум.од.

ІЛ-1 - концентрація сироваткового інтерлейкіну-1, пг/мл;

АОА - показник загальної антиоксидантної активності сироватки крові, % [5].

Збільшення числа оцінних критеріїв (ІЛ-1, АОА) і можливість інтерпретації величини P_k дещо посилюють інформативність, що допускає оцінку прогресування й ефективності терапії РА, з можливістю коректування її поточного курсу в перспективі. Однак, ІЛ-1 і АОА не корелюють з плином анемічного синдрому, величина P_k характеризує лише прогресування РА, що унеможливорює прогнозування плинину РА, сполученого з анемічним синдромом, переважно, з-поза відсутності інформативності застосованих критеріїв.

До основи дійсної корисної моделі поставлена задача винайти спосіб прогнозування плинину ревматоїдного артриту застосування котрого на основі опрацювання резерву біологічних маркерів крові сприяло б підвищенню інформативності прогнозу-

вання захворювання, ускладненого анемічним синдромом.

Поставлена задача вирішується тим, що при використанні способу прогнозування плинину ревматоїдного артриту, що включає відбір проби крові, як біологічного матеріалу, біохімічне та імунологічне дослідження сироватки, визначення в ній концентрацій прогностичних маркерів, розрахунок коефіцієнта та прогнозування за його величиною, відповідно до корисної моделі, додатково як прогностичні маркери залучають ІЛ-6, анти-MCV, як антитіло до цитрулінованого білка віментину, й ферітин, і прогнозують наявність певного цитокін-медійованого анемічного синдрому, або прогнозованого цитокін-медійованого анемічного синдрому, або відсутності анемії, якщо значення прогностичного коефіцієнту сягає $< 1,00$, або $1,00-2,50$, або $> 2,50$, відповідно, за умови, що прогностичний коефіцієнт розраховують на основі рівняння:

$P_k = \text{ІЛ-6} : \text{Анти-MCV} \cdot \text{Ферітин}$, де

P_k - прогностичний коефіцієнт, ум.од.

ІЛ-6 - концентрація сироваткового інтерлейкіну-6, пг/мл

Анти-MCV - концентрація антитіло до цитрулінованого білка віментину, U/ml

Ферітин - концентрація ферітину, нг/мл.

Причинно-наслідковий зв'язок сукупності відмінних ознак запропонованого рішення задачі з вищезазначеним технічним результатом полягає в наступному.

Залучення ІЛ-6 як прогностичного маркера зумовлене тим, що при захворюваннях, які характеризуються вираженим запальним компонентом, де послідовно секретуються фактори некрозу пухлин й ІЛ-1, ІЛ-6, раніш ніж ІЛ-1, починає пригнічувати їхню секрецію та активувати продукцію білків гострої фази запалення, що й зумовлює підвищення його концентрації у крові. Це допускає застосування ІЛ-6 як важливого ендogenous регулятора імунних і запальних процесів, медіатора гострих фаз запалення. Швидка й виражена реакція ІЛ-6 на дії різноманітних груп ендogenous та екзогенних субстанцій інформує про можливість його використання як раннього медіатора швидких реакцій на дії чужорідних патогенів. До того ж, ІЛ-6 збільшує масу у плазмі швидше за ІЛ-1, що допускає раннє виявлення ознак онтогенії РА на тлі анемічного синдрому.

Раніш властивості ІЛ-6 використали для прогнозування розвитку кахексії, анемії, плазмозитозу, гіперімунглобулінемії, нефриту, його мезангіальної форми, яка проліферує. ревматизму, хвороб Кастлмана і Крона, гострого панкреатиту [6,7] тощо. Їх використання для прогнозування плинину РА, сполученого з анемічним синдромом не виявлене.

Анти-MCV є природнім білком і більш специфічним маркером запалення ($> 98\%$) для РА. адже вони можуть виявлятися за декілька місяців (років) до дебюту артриту або під час трансформації неспецифічного суглобового синдрому в РА, з чутливістю -82 %. Анти-MCV також співізолюють про агресивний перебіг захворювання, у т.ч. про розвиток анемічного синдрому (A new potential marker for the diagnosis and prognosis of the rheumatoid arthritis - anti-MCV - Citrullinated Vimentin K.

Egerer, H. Bang, K. Liithke, A. Gauliard. E. Feist. E.P. Rudolph, G.R. Burmester, Z Rheumatol, 2005, 64: 8-9). При ретроспективному аналізі РА за Анти-MCV, у 85 % хворих виявляється ранній РА, а у порівнянні з його розгорнутою стадією відзначаються збільшення клінічної активності DAS28 ($5,23 \pm 0,8$), більш тривалий період ранкової скрутості ($p < 0,05$), частота виявлення позасуглобних проявів (43.3 %), у т.ч. анемічного синдрому (41 %). Концентрація антитіл корелює з показниками імунограми: IgG, IgA, CD38, CD2, CD1 lb, CD95, HLA-DR ($p < 0,05$).

На конференції, яка була присвячена ролі цитрулінованих білків в ревматології (Нідерланди, березень 2005 р.), підкреслювалося, що анти-MCV є надзвичайно специфічним маркером РА, навіть на вельми ранніх стадіях захворювання. Визначення цих антитіл, у сукупності з ІЛ-6 й ферітином, істотно збільшує інформативність прогностичного процесу, що допускає планування більш прогресивних терапевтичних стратегій, тому що для більшості з пацієнтів, з позитивним анти-MCV АТ, більш показовим є агресивний перебіг хвороби зі швидким прогресуванням анемічного синдрому.

Феритин в умовах ревматоїдного запалення надмірно синтезується під впливом цитокінімії. на фоні пригніченої продукції еритропоєтину. Завдяки цьому затримка заліза в макрофагах стає вагомою. Натомість, патологічні процеси РА знижують концентрацію за ii в циркуляції, чим лімітують доступне використання заліза еритроцитарними попередниками.

Поряд із цим, ФНП- α , ІЛ-1, 6 і 10 індують експресію ферітину й стимулюють збереження та ретенцію заліза у макрофагах. Наприклад, введення прозапальних цитокінів (ІЛ-1,6, ФНП- α) гризунам викликає розвиток гіпоферемії, анемії, які супроводжуються підвищенням цитокініндукованого синтезу ферітину (основного білка), що відбиває запаси заліза. При хронічному запаленні споживання заліза макрофагами відбувається головним чином за рахунок фагоцитозу еритроцитів і трансмембранного надходження Fe^{2+} . Саме дизрегуляція гомеостазу заліза веде до наступної недостатності належного для еритроїдних попередників заліза, ослабленню проліферації цих клітин внаслідок негативного впливу на них порушення біосинтезу гема.

Таким чином, сукупність ознак заявленої корисної моделі, що задіяна до вирішення поставленої задачі і реалізації технічного результату у запропонованому обсязі, є істотною, характеризує затребуваний обсяг правового захисту здійснюваного процесу, як невідомий з рівня техніки, а від того дозволяє кваліфікувати його «новим» і поширювати її на усі випадки багаторазової реалізації.

Даний спосіб був апробованим на клінічній базі кафедри терапії й сімейної медицини ФПО Дніпропетровської державної медичної академії, за участю лабораторії «Сінево», де був обстежений 21 хворий на РА.

При апробації способу було визначено, що збільшення числа оцінних критеріїв (ІЛ-6, Анти-MCV, феритин) і можливість інтерпретації величини P_k дещо посилюють інформативність, що допу-

скає оцінку прогресування РА з розвитком анемічного синдрому з можливістю коректування вказаних показників для усунення даного ускладнення в перспективі. Саме, ІЛ-6, Анти-MCV, феритин корелюють з плином анемічного синдрому, а величина P_k свідчить про прогресування РА з розвитком анемічного синдрому, що надає можливість прогнозування розвитку цитокін-медійованої анемії при РА, переважно, за рахунок високої інформативності застосованих критеріїв. Стійке зростання рівня ІЛ-6 у хворих на РА сприяє подальшому поглибленню анемічного синдрому.

Відзначено, що сукупність показників ІЛ-6, Анти-MCV й ферітину забезпечує підвищення інформативності процесу прогнозування перебігу РА на тлі цитокін-медійованої анемії.

Залучення ІЛ-6, Анти-MCV і ферітину забезпечує перевіршений «технічний результат» завдяки спроможності ІЛ-6 збільшувати масу у плазмі крові під впливом ранніх реакцій організму на запальний ревматоїдний процес, притаманний саме РА. Залучення ІЛ-6 зв'язане з його ранньою реакцією на онтогенез РА на тлі анемічного синдрому. Інформативність ІЛ-6 у поєднанні з Анти-MCV і ферітином повністю визначає прогнозування розвитку цитокін-медійованого анемічного синдрому.

Сутність. Для здійснення способу залучають набір реактивів компанії «Orgentec» (Німеччина) - для визначення концентрації Анти-MCV (білка віментину цитрулінованого), для визначення концентрації Ферітину - одностадійні тест-системи для визначення концентрації («Roche Elecsys», Швейцарія), для визначення концентрації ІЛ-6 імуноферментним шляхом - набір реактивів («Orgentec», Німеччина).

Для прогнозування плинності РА відбирають пробу крові, у кількості 10 мл. виділяють сироватку і визначають в ній концентрації прогностичних маркерів ІЛ-6, анти-MCV і ферітину. На їхній основі розраховують P_k , використовуючи рівняння:

$P_k = \text{ІЛ-6} : \text{Анти-MCV} \cdot \text{Феритин, де}$

P_k - прогностичний коефіцієнт, ум.од.

ІЛ-6 - концентрація сироваткового інтерлейкіну-6, пг/мл

Анти-MCV - концентрація антитіло до цитрулінованого білка віментину, U/ ml

Феритин - концентрація ферітину, нг/мл.

За величиною P_k прогнозують наявність певного цитокін-медійованого анемічного, або прогнозованого цитокін-медійованого анемічного синдрому, або відсутність анемії, якщо значення P_k становить $< 1,00$, або $1,00-2,50$, або $> 2,50$, відповідно.

Приклад 1. Хвора В., 40 років. Діагноз: РА: поліартрит, хворіє на РА понад 4 років, з перебігом анемічного синдрому, рефрактерного до тривалої терапії залізо утримуючими препаратами. У зв'язку з високою активністю РА хвора отримувала базисні препарати (лефлюнамід, метотрексат), але покращення еритропоезу не спостерігалось. 1 Іюня, під впливом анемії відбувалося погіршувався стану. Рівень антитіл у тіреопероксидазі становив 500 од.

Відбирали 5 мл крові, виділяли сироватку й визначали в ній концентрації ІЛ -6, анти-MCV й

ферітину: ІЛ-6 - 28,7 пг/мл, анти-MCV = 156,5 U/ml, ферітин = 4,5 нг/мл. Розраховували P_K :

$P_K = \text{ІЛ-6} : \text{Анти-MCV} \cdot \text{Ферітин} = 28,7 : 156,5 : 4,5 = 0,825$

За умов запропонованої корисної моделі прогнозували «наявність певного цитокін-медіованого анемічного синдрому», оскільки значення P_K становило $< 1,00$.

Тож, застосування біологічних маркерів крові, насамперед, сироваткового ІЛ-6, анти-MCV і ферітину для прогнозування плинності РА, ускладненого анемічним синдромом, інформувало про патологічний зсув перебігу РА у бік «певного цитокін-медіованого анемічного синдрому». Для корекції терапії, насамперед для покращення еритропоезу, призначали Актенру, як інгібітор цитокінів, що сприяло помітному покращенню стану хворої, вже через 5 днів.

Тож, наведений приклад клінічного використання запропонованого способу підтверджує можливість його відтворення в клініці внутрішніх хвороб (ревматології) з досягненням вищезазначеного технічного результату, що інформує про відповідність запропонованого технічного рішення критерію «промислова придатність» і допускає можливість його кваліфікації як корисної моделі процесу.

Джерела інформації:

1. Ivrafft A. Intravenous iron sucrose in two pregnant women with inflammatory bowel disease and severe iron deficiency anaemia / A. Krafft, C Breyman, R. Much V Ada Obstet Gynecol scand. -2000. - Vol. 79. -P.720-722.

2. Способ прогнозирования течения ревматоидного артрита: Пат. 2140079, С1. России. МПК G01N33/487 / Т.П. Сизых, Ж.С. Санжиева (Россия);

Иркутский гос. мед. ун-т Минздравмедпрома РФ (Россия). -№97114090/14; заявл. 18.08.97; опубл. 20.10.99.

3. Способ оценки эффективности терапии ревматоидного артрита: Пат. 2088930 С1 России, МПК G01N33/50 / Баженов А.Н. (Россия); Ижевский гос. мед. ин-т (Россия). -№ 94030765/14; заявл. 17.08.94; опубл. 27.08.97.

4. Лобаченко О.В. Прогнозирование течения ревматоидного артрита. -М: 2002. [http: // www.krsu.edu.kd /vestnik / 2002 / vi /a16.html](http://www.krsu.edu.kd/vestnik/2002/vi/a16.html).

5. Способ прогнозирования течения суставной формы ревматоидного артрита: Наг. 2343487 С1 России. МПК G01N33/68. G01N33/50/ Горбунов В.В., Захарова О.Д., Росин И.В., Миргород Е.Э. (Россия); Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования Читинская государственная медицинская академия (Россия). -2007121161/15; заявл. 05.06.07; опубл. 10.01.09.

6. Застосування сироваткового інтерлейкіну-6 як прогностичного маркера плинності гострого панкреатиту: Пат. 47880 України, МПК G01N 33/48, G01N 33/49, G01N 33/50 / Баранник СІ., Родинська Г.О. (Україна). -№ u200909620; заявл. 21.09.09; опубл. 2010.

7. Фармацевтическая композиция для профилактики или лечения заболевания, вызываемых образованием IL-6: Пат. 2147442 России. МПК A61K39/395. A61 P7/00. A61P35/00, A61P37/00, A61P43/00 / Тадамицу Кисимото, Асао Кацуме. Хироюки Сайто (Япония); Тадамицу Кисимото; Чугаи Сейяку К.К. (Япония). -№ 97108070/14; заявл. 20.10.95; опубл. 20.04.00; Конв. приор. Японии 95/02169 от 20.10.95. Патент-аналог WO 96/12503 от 02.05.96.