



УКРАЇНА

(19) UA (11) 65807 (13) U
(51) МПК
G01N 33/48 (2006.01)ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ СТУПЕНЯ ТЯЖКОСТІ ДІАБЕТИЧНОЇ РЕТИНОПАТІЇ

1

(21) u201108510

(22) 07.07.2011

(24) 12.12.2011

(46) 12.12.2011, Бюл. № 23, 2011 р.

(72) БИЧКОВА НІНА ГРИГОРІВНА, ТАХА САЛАХ АХМАД, РОЗУМІЙ НАТАЛІЯ МИХАЙЛІВНА, РЯ-БОКОЖУШНА ЛЮДМИЛА МИКОЛАЇВНА, СКРИПНИК РІМА ЛЕОНІДІВНА, ЛІСОВЕЦЬ ОЛЕКСАНДР ВІКТОРОВИЧ

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

(57) Спосіб оцінки ступеня тяжкості діабетичної ретинопатії, що включає дослідження крові, який **відрізняється** тим, що в сироватці крові визначають концентрацію циркулюючих імунних комплексів великого, середнього та малого розміру на спектрофотометрі при довжині хвилі 450 нм, отримані результати виражають в умовних одиницях за формулою:

2

 $ЦІК = (E_1 - E_0) \times 1000$, де

ЦІК - циркулюючі імунні комплекси;

 E_1 - дослід, одиниць екстинкції; E_0 - контроль, одиниць екстинкції,і при зниженні концентрації ЦІК великого розміру до $16,53 \pm 0,36$ ум.од. та збільшенні кількості ЦІК середнього розміру до $91,56 \pm 1,37$ ум.од. та малого розміру до $49,15 \pm 0,82$ ум.од. діагностують проліферативну діабетичну ретинопатію; при зниженні концентрації ЦІК великого розміру до $27,08 \pm 0,47$ ум.од. та збільшенні кількості ЦІК середнього розміру до $73,42 \pm 1,25$ ум.од. та малого розміру до $31,86 \pm 0,64$ ум.од. діагностують препроліферативну діабетичну ретинопатію; при зниженні концентрації ЦІК великого розміру до $36,14 \pm 0,82$ ум.од. та збільшенні кількості ЦІК середнього розміру до $57,31 \pm 1,14$ ум.од. та малого розміру до $18,70 \pm 0,49$ ум.од. діагностують непроліферативну діабетичну ретинопатію.

Корисна модель, що заявляється, належить до галузі медицини, зокрема до офтальмології, ендокринології, клінічної імунології, і призначена для оцінки ступеня тяжкості діабетичної ретинопатії: непроліферативної, препроліферативної та проліферативної.

Цукровий діабет (ЦД) є однією з найсуттєвіших медико-соціальних проблем сучасного суспільства, який займає третє місце серед причин загальної смертності населення після серцево-судинних та онкологічних захворювань [1]. На даний час у світі нараховується понад 150 мільйонів хворих на ЦД, зокрема в Україні - понад 1 млн., з них у 40 % ЦД супроводжується розвитком діабетичної ретинопатії (ДРП) [2, 3]. ДРП являє собою судинне ускладнення, яке розвивається в сітківці ока внаслідок ЦД і є основною причиною сліпоти серед осіб віком від 20 до 65 років. Ступінь тяжкості ДРП залежить від тривалості захворювання та швидкості його прогресування. При тривалості ЦД до 5 років - частота розвитку ДРП складає від 5 до 17 %, від 5 до 10 років - частота розвитку ДРП від 44 до 80 %, а при тривалості ЦД більше 15 років - 87-90 % [4, 5, 6]. Для діагностики ДРП користують-

ся класифікацією Kohnen та Porta [7], згідно з якою існує 3 стадії ДРП: непроліферативна (НПДРП), препроліферативна (ППДРП) та проліферативна (ПДРП).

На даний час встановлено, що в патогенезі діабетичної ретинопатії суттєва роль належить імунним та метаболічним порушенням, розладу мікроциркуляції ока, проте єдиної концепції патогенезу не сформульовано [8]. При ПДРП встановлено зниження кількості Т-лімфоцитів, дефект Т-супресивної функції лімфоцитів, активація аутоімунних механізмів, в результаті яких в кровоносному руслі утворюється велика кількість циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) [8, 9]. Автори вважають, що ЦІК активують систему комплементу, стимулюють виділення медіаторів гуморального та клітинного імунітету і можуть бути патогенетичним фактором деструкції судинної стінки, порушення мікроциркуляторної цілісності та реологічних змін. Агресивні ЦІК малого розміру, що не елімінуються фагоцитами, тривалий час циркулюють в крові, осідаючи на стінках судин, викликають імунне запалення, що призводить до пошкодження капілярів, порушення мікроциркуляції та стимуля-

(19) UA (11) 65807 (13) U

ції проліферативних процесів в сітківці ока [8, 9, 10]. Відомо, що найбільшу пошкоджуючу дію виявляють патогенні ЦІК середнього (середньомолекулярні з константою седиментації 11-19 S) та малого (дрібно-молекулярні з константою седиментації < 11 S) розміру, які утворюються при надлишку антигену та характеризуються тривалою циркуляцією та високою комплементактивуючою здатністю [11].

Існуючі на даний час способи діагностики не можуть повною мірою достовірно оцінити ступінь тяжкості діабетичної ретинопатії та її стадію.

Найбільш близьким до способу, що заявляється, вибраний як прототип, є спосіб, що включає дослідження крові шляхом визначення кількості патогенних ЦІК [10].

Проте даний спосіб не дозволяє оцінити стадію діабетичної ретинопатії, оскільки в даному прототипі визначення концентрації ЦІК проводилась без урахування стадії діабетичної ретинопатії, а також розміру патогенних та фізіологічних ЦІК.

З огляду на вищезазначене очевидно, що вирішення проблеми оцінки ступеня тяжкості діабетичної ретинопатії є надзвичайно актуальним.

Задача, яку вирішує корисна модель, що заявляється, полягає у створенні ефективного способу оцінки ступеня тяжкості діабетичної ретинопатії, який би дозволив чітко диференціювати її стадію, 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 ступеня тяжкості патології.

Технічний результат, що досягається корисною моделлю у запропонованому способі, на відміну від прототипу, полягає у дослідженні в сироватці крові кількості циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) різного молекулярного розміру із визначенням вмісту найбільш патогенних ЦІК середнього та малого розміру, які мають патогенетичне значення в перебігу діабетичної ретинопатії.

Поставлена задача вирішується тим, що у відомому способі, що включає дослідження крові, згідно з корисною моделлю, в сироватці крові визначають концентрацію циркулюючих імунних комплексів великого, середнього та малого розміру 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;

E_1 - дослід, одиниць екстинкції;

E_0 - контроль, одиниць екстинкції,

і при зниженні концентрації ЦІК великого розміру до $16,53 \pm 0,36$ ум.од. та збільшенні кількості ЦІК середнього розміру до $91,56 \pm 1,37$ ум.од. та малого розміру до $49,15 \pm 0,82$ ум.од. діагностують проліферативну діабетичну ретинопатію; при зниженні концентрації ЦІК великого розміру до $27,08 \pm 0,47$ ум.од. та збільшенні кількості ЦІК середнього розміру до $73,42 \pm 1,25$ ум.од. та малого розміру до $31,86 \pm 0,64$ ум.од. діагностують препроліферативну діабетичну ретинопатію; при зниженні концентрації ЦІК великого розміру до $36,14 \pm 0,82$ ум.од. та збільшенні кількості ЦІК середнього розміру до $57,31 \pm 1,14$ ум.од. та малого розміру до $18,70 \pm 0,49$ ум.од. діагностують непроліферативну діабетичну ретинопатію.

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

За відомими літературними даними такий спосіб оцінки ступеня тяжкості діабетичної ретинопатії невідомий.

Спосіб 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 55 мл 1,24 % розчину борної кислоти додають 45 мл 1,9 % розчину бури і доводять об'єм до 1 л. 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 [12].

Схема постановки:

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

Після внесення до пробірок всіх інгредієнтів вміст перемішати. Проби інкубуємо 1 годину при кімнатній температурі, після чого проводимо визначення концентрації ЦІК на спектрофотометрі при довжині хвилі 450 нм у кюветі $1 \times 1 \text{ см}^3$ за оптичною густиною відповідних зразків. Отриманий на

спектрофотометрі результат відповідає концентрації ЦІК в одиницях екстинкції, а після його множення на тисячу - отримували кількість ЦІК в умовних одиницях в 100 мл сироватки крові за формулою:

$$ЦІК=(E_1-E_0) \times 1000,$$

де E₁ - дослід, E₀ - контроль.
Конкретні приклади виконання.

Приклад 1

Хвора Л., 51 р. Перебувала на стаціонарному лікуванні з діагнозом: Діабетична ангіоретинопатія, непроліферативна стадія. Хворіє на цукровий діабет II типу протягом 5 років. При офтальмологічному обстеженні у хворої визначалося: патологічні зміни сітківки ока та її судин, які проявлялися наявністю легкого розширення вен та звуженням артерій - А:В - 1:3, наявністю мікроаневризм судинної стінки та поодинокими м'якими та твердими ексудатами.

В імунограмі рівень циркулюючих імунних комплексів становив: середнього розміру - 58,1 ум.од., малого - 17,8 ум.од., великого розміру - 35,9 ум.од.

Приклад 2

Хвора А., 62 р. Перебувала на стаціонарному лікуванні з діагнозом: Діабетична ангіоретинопатія, препроліферативна стадія. Хворіє на цукровий діабет II типу протягом 8 років, має супутню есенціальну гіпертензію. При офтальмологічному обстеженні у хворої визначалося: диск зорового нерва блідо-рожевий, з чіткими контурами, вени сітківки розширені, нерівномірні, чоткоподібні, спостерігається венозна петля, м'які та тверді ексудати. Наявні точкові геморагії та візуалізуються ішемічні зони сітківки.

В імунограмі рівень циркулюючих імунних комплексів становив: середнього розміру - 71,5 ум.од.,

малого - 30,2 ум.од., великого розміру - 26,7 ум.од.

Приклад 3

Хвора Б., 75 р. Перебувала на стаціонарному лікуванні з діагнозом: Діабетична ангіоретинопатія, проліферативна стадія. Хворіє на цукровий діабет II типу протягом 20 років, має супутню есенціальну гіпертензію. При офтальмологічному обстеженні у хворої визначалося: мікроаневризми судин всіх квадрантів сітківки, інтраретинальні точкові та штрихоподібні геморагії. Вени сітківки розширені, повнокровні, нерівномірного калібру, четкоподібні. Артерії - звужені, склерозовані. Також спостерігаються новоутворені судини, розрив сітківки правого ока, утворення фіброзних шварт лівого ока.

В імунограмі рівень циркулюючих імунних комплексів становив: середнього розміру - 89,6 ум.од., малого - 47,1 ум.од., великого розміру - 15,9 ум.од.

Статистична обробка отриманих результатів виконана на персональному комп'ютері з використанням пакета прикладних програм Microsoft XP "Excel".

По запропонованому способу було обстежено 91 хворого на діабетичну ретинопатію і отримані результати виявили високу інформативність запропонованого способу в порівнянні зі способом-прототипом (табл.). Контрольну групу склали 30 здорових осіб, співставлюваних за віком та статтю.

Таблиця

Концентрація ЦІК у хворих на діабетичну ретинопатію в залежності від стадії захворювання (M + m, n=91)

Досліджувані параметри	Непроліферативна стадія ДРП	Препроліферативна стадія ДРП	Проліферативна стадія ДРП	Контрольна група
ЦІК великого розміру, ум.од	36,14±0,82* **	27,08±0,47* **	16,53±0,36* **	51,45±1,37
ЦІК середнього розміру, ум.од	57,31±1,14* **	73,42±1,25* **	91,56±1,37* **	34,79±1,18
ЦІК малого розміру, ум.од	18,70±0,49* **	31,86±0,64* **	49,15±0,82* **	11,23±0,46

Примітка: * - p<0,05 - достовірність різниці показників між стадіями ДРП;

** - достовірність різниці показників відносно даних здорових осіб.

Отримані результати дослідження концентрації ЦІК різного молекулярного розміру співпали зі стадією хвороби, коли зростання тяжкості захворювання супроводжувалося підвищенням рівня патогенних ЦІК середнього та малого розміру.

Перевагою запропонованого способу є те, що він дозволяє чітко диференціювати ступінь тяжкості та стадію діабетичної ретинопатії, 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 ступеня тяжкості та стадії патології, дозволяє вчасно призначити хворому необхідний курс лікування, враховуючи ступінь тяжкості захворювання.

Джерела інформації:

1. Тронько М.Д. Епідеміологія цукрового діабету в Україні / М.Д. Тронько, А.Д. Чернобров // Здоров'я України. - 2005. - №18 (127). - С 15.

2. Пасечникова Н.В. Клиническая классификация и тактика лазерного лечения больных с диабетическим макулярным отеком / Н.В. Пасечникова, В.А. Науменко, А.В. Сборовская // Одеський мед. журнал. - 2009. - №6. - С. 77-79.

3. Крыжановская Т.В. Инвалидность вследствие офтальмологических осложнений сахарного диабета в Украине / Т.В. Крыжановская // Матеріали 11 міжнародної наук.-практ. конф. "Сучасні аспекти судинно-ендокринних захворювань органів зору". - К., 2005. - С. 72.

4. Воробьева И.В. Практические рекомендации больным с диабетической ретинопатией / И.В. Воробьева, М.Ю. Репкина // Русский медицинский журнал. - 2009. - Т. 17. - №24. - С. 1591-1596.

5. Bandurska-Stankiewicz E. Programme preventing vision loss due to diabetes / E. Bandurska-Stankiewicz, D. Wiatr // *Klin. Oczna.* - 2007. - V.109 (7-9). - P. 359-362.

6. Shaw J.E. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030 / J.E. Shaw, R.A. Sicree, P.Z. Zimmet // *Diabetes Res. Clin. Pract.* - 2010. - V.87(1). - P. 4-14.

7. Kohner E. Protocols for screening and treatment of diabetic retinopathy in Europe / E. Kohner, M. Porta // *Eur. J. Ophthalmol.* - 1991. - V. 1(1). - P. 45-54.

8. Бичкова Н.Г. Стан імунної системи у хворих на цукровий діабет II типу / Н.Г. Бичкова // Проблеми військової охорони здоров'я. Збірник наукових праць Української військово-медичної академії. - 2010. - Вип. №27. - С. 193-200.

9. Аутоиммунные и иммунокомплексные реакции в патогенезе диабетических ангио- и ретино-

патии / И.М. Логай, А.М. Гелуненко, А.М. Петруня [и др.] // *Офтальмол. Журнал.* - 1998. - №2. - С. 125-127.

10. Балашова Л.М. Антитела к коллагену II и IV типов, фактор некроза опухоли альфа и циркулирующие иммунные комплексы в слезе и сыворотке крови у больных с различными стадиями ангиоретинопатии / Л.М. Балашова // *Вестник офтальмологии.* - 2000. - №3. - С. 31-34.

11. Бирюков А.А. Патогенетическое значение циркулирующих иммунных комплексов у больных с сочетанной хронической соматической патологией / А.А. Бирюков // *Имунологія та алергологія.* - 2007. - №2. - С. 81-82.

12. 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.