



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **105589** (13) **U**
(51) МПК (2016.01)
A61B 10/00
G01N 33/50 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2015 09415	(72) Винахідник(и): Кобись Тетяна Олександрівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 30.09.2015	(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ, бул. Шевченка, 13, м. Київ, 01601 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.03.2016	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.03.2016, Бюл.№ 6	

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ПРОЯВІВ АКТИВНОСТІ ДЕМІЄЛІНІЗУЮЧОГО ПРОЦЕСУ У ХВОРИХ НА РОЗСІЯНИЙ СКЛЕРОЗ

(57) Реферат:

Спосіб визначення проявів активності демієлінізуючого процесу у хворих на розсіяний склероз передбачає використання клінічних ознак на початку захворювання. Проводять дослідження синтезу і секреції прозапальних та протизапальних цитокінів. При стійкому підвищенні прозапальних цитокінів визначають прояви активності демієлінізуючого процесу у хворих на розсіяний склероз.

UA 105589 U

Корисна модель належить до галузі медицини, а саме до неврології і призначена для визначення проявів активності демієлінізуючого процесу у хворих на розсіяний склероз

Розсіяний склероз (РС) - хронічне запальне автоімунне демієлінізуюче захворювання центральної нервової системи. При розсіяному склерозі активовані Т-лімфоцити долають гематоенцефалічний бар'єр і призводять до утворення характерних запальних вогнищ в головному мозку. З імунологічної точки зору хронічне запалення при розсіяному склерозі представляється запальним процесом з невизначеним строком закінчення. Одним з факторів персистенції запального інфільтрату в центральній нервовій системі є продукція in-situ підтримують прозапальних факторів - цитокінів, які попереджають видалення імунотоксичних клітин, що надійшли в центральну нервову систему з крові [1, 2].

Сучасні уявлення про патогенез розсіяного склерозу підтверджують розвиток імунотоксичних реакцій у нервовій тканині. Зміни імунного статусу у пацієнтів з розсіяним склерозом знаходяться залежно від стадії захворювання та характеру його перебігу. Особливу увагу дослідники приділяли вивченню рівня в крові цих хворих вмісту Т-хелперів і Т-супресорів [2]. Теоретично передбачалося, що у хворих розсіяним склерозом повинно бути зменшений вміст Т-супресорів і підвищений вміст Т-хелперів, що і було встановлено [14, 17]. Однак, зниження рівня Т-супресорів було виявлено тільки у 50 % хворих в період загострення [2, 6, 7]. Останнім часом у літературі обговорюється значення порушення балансу про- і протизапальних цитокінів в патогенезі розсіяного склерозу [12]. Приділяється увага підвищенню активності Тх1-лімфоцитів і моноцитів і продукції імунотоксичними клітинами прозапальних цитокінів ІЛ-1, ІЛ-6, ІЛ-12, ФНП-альфа, ІФН-гамма. У патогенезі розсіяного склерозу важливе значення займає порушення цитокінової регуляції як інтратекальної, так і периферичних механізмів імунної відповіді. Наприклад, у зразках мозку хворих на розсіяний склероз знайдені відсутні в нормі при інших неврологічних захворюваннях незапального характеру клітинно-асоційовані форми ФНП-альфа та ІЛ-1.

Продукція ІЛ-1 була зареєстрована і в гістологічно незмінній паренхімі мозку хворих розсіяним склерозом, але найбільш активна продукція цього цитокіну зареєстрована саме в активних вогнищах. Гістохімічні дослідження показали, що в мозку хворих розсіяним склерозом ІЛ-1 з'являється на макрофагах в центрі осередків і в мікроглії. Вказується, що відсутнє підвищення рівня ІЛ-1 в сироватці крові та лікворі частіше спостерігається при активному перебігу захворювання [4, 9]. У більшості досліджень відзначено підвищення вмісту ІЛ-6 в лікворі хворих РС. Механізми участі ІЛ-6 у патогенезі розсіяного склерозу можуть бути пов'язані з характерними для цього захворювання ознаками поліклональної активації В-системи імунітету.

У той же час деякі дослідники вважають, що ІЛ-6 впливає на диференціювання нейронів і ремієлінізацію і підвищення його продукції має протизапальний характер. ІЛ-10 продукується хелперами 2 типу, меншою мірою - макрофагами і В-клітинами [4]. Основними властивостями ІЛ-10 є стимуляція гуморального і пригнічення клітинного імунітету. Цей цитокін має супресорний дію на аутоантигенами презентацію, Т-клітинну - опосередковану імунну реактивність, продукцію протизапальних цитокінів макрофагами і Т-хелперами 1 типу.

Таким чином, ІЛ-10 має виражену протизапальну дію. Однак, суперечливі результати, які отримані при дослідженні динаміки експресії ІЛ-10 клітинами крові та ліквору хворих РС, залишають відкритим питання про значення цього цитокіну в патогенезі розсіяного склерозу [7, 8]. ФНП-альфа є цитотоксичним для олігодендроцитів і може надавати безпосередньо шкідливу дію на мієлін. Продукція ФНП-альфа в тканинах мозку характерна для розсіяного склерозу і досягає максимуму в хронічних вогнищах з реактивацією процесу по краях. Макрофаги в центрі осередків і мікроглія в гістологічно незмінній паренхімі також здатна виробляти ФНП-альфа. Дослідження проукції ФНП-альфа культурами клітин крові виявляє більш високий рівень порівняно з контролем. ІФН-γ є плейотропним цитокіном, який синтезується, головним чином, активованими Т-хелперами 1 типу в результаті стимуляції Т-клітинними мітогенами і специфічними вірусними агентами. Пік вироблення ІФН-γ становить 72 години після антигенної стимуляції.

У кінцевому результаті ми не маємо жодного параметра, який би остаточно визначав ступінь активності захворювання. Існує дисоціація клінічних та МРТ проявів активності захворювання. Клінічно безсимптомні гострі поразки є частим явищем, яке спостерігається за даними різних авторів [2, 10, 11, 13] в 5-10 разів частіше, ніж рецидиви. Тому подальше вивчення взаємозв'язку клініко-імунологічних ознак активності демієлінізуючого процесу у хворих на розсіяний склероз протягом тривалого періоду спостереження за пацієнтами є надзвичайно актуальним.

Найближчим аналогом до корисної моделі є спосіб прогнозування перебігу гострого розсіяного склерозу шляхом використання клінічних та нейровізуалізаційних ознак при дебюті захворювання (12).

Недоліком найближчого аналога є його недостатня точність.

В основу корисної моделі поставлена задача визначити взаємозв'язок між клінічними і імунологічними ознаками активності перебігу розсіяного склерозу для покращення діагностики та оптимізації прогнозу захворювання.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб передбачає використання клінічних ознак на початку захворювання, згідно з корисною моделлю, проводять дослідження синтезу і секреції прозапальних та протизапальних цитокінів і при стійкому підвищенні прозапальних цитокінів визначають прояви активності демієлінізуючого процесу у хворих на розсіяний склероз.

Обстежено 72 хворих (40 жінок і 32 чоловіків) з рецидивуючо-ремітуючим типом перебігу розсіяного склерозу, які спостерігалися в Київському міському центрі розсіяного склерозу на базі міської клінічної лікарні № 4 протягом 2005-2013 рр. Діагноз розсіяний склероз встановлювався на підставі критеріїв McDonald et al., 2005 р. Вираженість неврологічних симптомів оцінювали за шкалою EDSS (Kurtzke J., 1983 р.)

Дослідження синтезу і секреції прозапальних та протизапальних цитокінів ІЛ-1, ІЛ-2, ІЛ-4, ІЛ-6, ІЛ-10, ФНП-альфа, ІФН-гамма проводили в культурі мононуклеарів людини. Останні були отримані зі свіжої культури гепаринізованої крові шляхом центрифугування в градієнті щільності "Histopaque-1077" ("Sigma", США). 5×10^6 /мл клітин були суспензовані в збагаченому культурному середовищі RPMI-1640 ("Gibco", США) з 5 % термоінактивованою сироваткою телят (FNS) і інкубували при 37 °C протягом 1 години. Неагрегантні клітини були відмиті з культурального планшета, а залишилися клітини в збагаченому, середовищі RPMI-1640 з додаванням 10 мкг/мл ліпополісахариду ("Sigma", США) протягом 6 годин.

Статистичну обробку отриманих даних проводили з використанням програмного пакету Statistica 10.0 ("StatSoft, Inc.", США) і Microsoft® Excel 2010 ("Microsoft Corporation", США).

Вік обстежених коливався від 18 до 53 років із середнім значенням $32,7 \pm 0,92$ року. Тривалість захворювання становила від 0,5 до 11,25 року, в середньому - $3,64 \pm 0,27$ року. Інвалідизація хворих за шкалою EDSS становила в середньому $3,32 \pm 0,12$ бала (від 1,5 до 5,5 бала).

Основною клінічною характеристикою активності перебігу РРРС є частота загострень. У групі спостереження перебували хворі з частотою загострень від 0,39 до 6 на рік. Середня частота загострень була $1,66 \pm 0,12$ на рік. Залежно від частоти загострень пацієнти були розподілені на дві групи з частотою <2 і ≥ 2 на рік. При подальшому розвитку захворювання у 47 пацієнтів спостерігалось до 2 загострень захворювання на рік, у 25-2 і більше загострень на рік.

Проведено дослідження рівня цитокінів у хворих з розсіяним склерозом. Середній рівень ІЛ-1 у хворих з розсіяним склерозом був $4,2 \pm 0,39$ пг/мл з розмахом значень від 6,71 до 10,7 пг/мл, рівень ІЛ-4 $2,4 \pm 0,14$ пг/мл з мінімальним і максимальним значенням 0,23 і 4 пг/мл відповідно, рівень ІЛ-6 становив $2,82 \pm 0,19$ пг/мл з розмахом значень від 0,5 до 5,9 пг / мл, ІЛ-10 $4,68 \pm 0,39$ пг/мл із значеннями від 0,6 до 11,4 пг/мл. У хворих на розсіяний склероз визначені значення таких важливих прозапальних цитокінів як ФНП та ІФН- γ . Середній показник для ФНО був $2,32 \pm 0,17$ пг/мл, а для ІФН- γ $-4,38 \pm 0,4$ пг/мл.

Рівень цитокінів досліджений у двох групах пацієнтів - із частотою загострень <2 в рік і з частотою загострень ≥ 2 загострень на рік. Різниця показників для груп пацієнтів з різною частотою загострень було статистично достовірним для ІЛ-1, ІЛ-10, ІФН- γ . У пацієнтів з кількістю загострень ≥ 2 в рік рівень прозапальних цитокінів ІЛ-1 і ІФН- γ становив $7,9 \pm 0,47$ пг/мл і $7,89 \pm 0,47$ пг/мл відповідно ($P < 0,05$). Дослідження рівня цитокінів у пацієнтів з розсіяним склерозом проводили як в стадії загострення так і ремісії захворювання. Для пацієнтів з кількістю загострень <2 в рік рівень даних цитокінів був меншим і становив відповідно $2,19 \pm 0,21$ пг/мл і $2,5 \pm 0,26$ пг/мл ($P < 0,05$). Таким чином, за результатами наших досліджень було виявлено, що функціональна напруженість імунітету залишається підвищеною у хворих з активним перебігом захворювання в різні фази захворювання, що може свідчити про те, що імунопатологічний процес має безперервний перебіг при розсіяному склерозі. Висока проникність гематоенцефалічного бар'єру, можливо, сприяє субклінічній появі нових вогнищ демієлінізації у таких хворих. У хворих з низьким рівнем загострень (<2 на рік) зберігається достовірно високий ($P < 0,05$) рівень цитокіну ІЛ-10 ($6,06 \pm 0,45$ пг/мл) порівняно з пацієнтами, які мають більш активний перебіг захворювання ($2,1 \pm 0,33$ пг/мл), що підтверджує його протизапальну функцію.

Для визначення взаємозв'язку рівня цитокінів з клінічною активністю захворювання був проведений кореляційний аналіз між рівнем прозапальних цитокінів і рівнем загострень. Було

виявлено прямий сильний кореляційний взаємозв'язок між рівнем ІЛ-1, ІФН- γ і кількістю зареєстрованих загострень на рік ($r_s=0,753$ і $r_s=0,7$ ($P<0,05$) відповідно). Також була виявлено прямий середній кореляційний зв'язок рівня ІЛ-6, ФНП-альфа з кількістю загострень на рік ($r_s=0,515$ і $r_s=0,474$ ($P<0,05$) відповідно), що також підтверджує безперервність імунопатологічного процесу при розсіяному склерозі

Імунопатологічний процес при розсіяному склерозі має безперервний перебіг, на що вказує стійке підвищення прозапальних цитокінів у хворих з активним перебігом захворювання і сильний кореляційний зв'язок рівня цитокінів з кількістю загострень захворювання.

Визначення клініко-лабораторних маркерів активності перебігу розсіяного склерозу в кінцевому підсумку має значення для контролю ефективності патогенетичної терапії та подальшої тактики лікування пацієнтів.

Джерело інформації:

1. Паєнок А.В., Яворська Н.П., Євтушенко С.К. 14-й конгрес Європейської федерації неврологічних товариств (м. Женева, 25-28 вересня 2010 р.) Міжнародний неврологічний журнал. - 2011. - № 3 (41). - с. 136-141.

2. Шмидт Т.Е., Яхно Н.Н. Рассеянный склероз. // 2012. - Москва, МЕ. Дпресс-информ. – 272 с.

3. Bornsen L., Khademi M., Olsson T. Osteopontin concentrations are increased in cerebrospinal fluid during attacks of multiple sclerosis // MS Journal. - 2006 Vol.17. - № 9. - p. 1113-1121.

4. Dobson R. An under-studied source of biomarkers in Multiple Sclerosis // MS and related disorders. - 2012. - Vol.1. - P. 76-80.

5. Frisher J.M., Bramow S., Dal-Bianco A, et al. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. // Brain. - 2009. - № 132. - P. 1175-1189.

6. Fox E. Immunopathology of multiple sclerosis // J. Neurology, 2004. У.63, Р. 3-7.

7. Jurewicz A. et al. Tumour necrosis factor-induced death of adult human oligodendrocytes is mediated by apoptosis inducing factor // Brain., 2005. Vol. 128, P. 2675-2688.

8. Miller A., Aidan N., Tzunz-Henig N. Translation towards personalized medicine in Multiple Sclerosis // J. of the Neurolog. Sc. 2012. - Vol. 274. - P. 68-75.

9. Martino G., Adorini L. et al. Inflammation in multiple sclerosis: the good, the bad, and the complex. // Lancet Neurology. 2010. V. 1., Issue 8. - P. 499-509.

10. Polman C.H., Reingold S.C., Banwell B. et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria // Ann. Neurol. - 2011. - Vol. 69. - P. 292-302.

11. Ramagopalan S.P., Dobson R., Meier U.C. Multiple sclerosis: risk factors, prodromes, and potential causal pathways // Lancet Neurol. - 2010. - Vol.9. - P. 727-739.

12. Trofta P.P. Cytokines // Amer.J. Reprod. Immunol., 2011. V.25. P. 1734-1741.

13. Ziemssen T., Tintore M. A new era in multiple sclerosis: new consideration for therapeutic approaches. // Elsevier. - 2010. - 94 p.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб визначення проявів активності демієлінізуючого процесу у хворих на розсіяний склероз, що передбачає використання клінічних ознак на початку захворювання, який **відрізняється** тим, що проводять дослідження синтезу і секреції прозапальних та протизапальних цитокінів і при стійкому підвищенні прозапальних цитокінів визначають прояви активності демієлінізуючого процесу у хворих на розсіяний склероз.