



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **116048**

(13) **U**

(51) МПК

G01N 33/49 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2016 10415**

(22) Дата подання заявки: **13.10.2016**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **10.05.2017**

(46) Публікація відомостей **10.05.2017, Бюл.№ 9**
про видачу патенту:

(72) Винахідник(и):

**Мочульська Оксана Миколаївна (UA),
Федорців Ольга Євгенівна (UA)**

(73) Власник(и):

**ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ
ЗАКЛАД "ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ
ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО МОЗ
УКРАЇНИ",
вул. Майдан Волі, 1, м. Тернопіль, 46001
(UA)**

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ АТОПІЧНОГО ДЕРМАТИТУ У ДІТЕЙ

(57) Реферат:

Спосіб діагностики atopічного дерматиту у дітей шляхом анамнестичного, загально-клінічного обстеження, дослідження клітинної і гуморальної ланок імунітету із визначенням концентрації субпопуляцій лімфоцитів (CD3, CD4, CD8, CD16, CD19) та імуноглобуліну Е (IgE). Додатково визначають рівні сироваткових імуноглобулінів (IgA, IgG), інтерлейкінів (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10) та гістаміну в сироватці крові за допомогою тест-систем. При зниженні рівнів IgA, IL-2, підвищенні рівнів IgE, IgG, IL-4, IL-6, IL-10 та гістаміну в сироватці крові достовірно вище норми діагностують atopічний дерматит.

UA 116048 U

Корисна модель належить до медицини, зокрема педіатрії, дерматології, алергології, імунології, і може бути використана для діагностики atopічного дерматиту у дітей.

Діагностика atopічного дерматиту (АД) у більшості країн світу базується на клінічному обстеженні хворого на основі алгоритму, розробленого із діагностичних критеріїв J.M. Hanifin та G. Rajka (1980). Згідно з цим алгоритмом виділяють головні ("великі") й додаткові ("малі") критерії. Діагноз АД встановлюється за наявності комбінації не менше 3 "великих" і 3 "малих" критеріїв за мінімальної тривалості збереження симптоматики не менше 6 тижнів [1].

Діагностика АД досі залишалася клінічною, оскільки наразі не існувало надійних біомаркерів, здатних диференціювати це захворювання від інших. Також існують параклінічні методи діагностики АД. Лабораторні показники, що найчастіше пов'язуються з цим захворюванням: збільшення рівнів загального сироваткового та алерген-специфічних IgE, рівня еозинофілів у периферичній крові. У більшості випадків atopічний анамнез і типова клініка захворювання дозволяють встановити діагноз і тяжкість перебігу АД. Однак на цьому діагностичний пошук не закінчується. Відкриття нових субпопуляцій лімфоцитів, а також нових цитокінів та хемокинів, сформувано безліч додаткових потенційних біомаркерів [4].

Загальновідомо, що найбільш достовірні і суттєві зміни при захворюванні відмічені в імунній системі організму та спрямованості її відповіді на антигени. Імунопатологічний процес у шкірі є наслідком змін системного імунітету. В типових випадках діагностика АД не викликає ускладнень і проводиться згідно з наведеним алгоритмом. Проте при нетиповому перебігу АД, приєднанні ускладнень, тривалому лікуванні досить складно встановити діагноз. Відомий спосіб діагностики АД шляхом визначення імунокомпетентних клітин Т-хелперів (CD4) і Т-супресорів (CD8), що підсилюють продукцію IgE В-лімфоцитами і збільшують тривалість життя еозинофілів [1].

Найближчим аналогом, який вибраний як прототип, є спосіб діагностики atopічного дерматиту у дітей шляхом визначення кількісних значень CD3, CD4, CD5, CD8, CD16, CD20, CD22, CD38, HLA-Dr, IgE, C-3-фракції комплементу, IL-4, IL-13 у "мазках-відбитках шкіри" у дітей з вогнищ ураження [3] та в мікробіоптатах шкіри, отриманих шляхом пункційної біопсії голкою [2].

Даний спосіб діагностики АД є достатньо ефективним, бо визначає головні імунокомпетентні клітини, які мають значення в патогенезі захворювання. Перевагою методу також є визначення локальних біомаркерів алергічного запалення за даними імунологічних досліджень. Ці способи є найбільш близькими до корисної моделі та вибрані як найближчі аналоги.

Основним недоліком відомих способів діагностики АД, у тому числі прототипу, є недостатня діагностична інформативність, яка полягає у тому, що імунокомпетентні клітини з маркерами алергічного запалення визначають тільки в шкірі хворих.

При розгляді технічної задачі було взято до уваги те, що не завжди можна отримати достовірну відповідь про наявність системного алергічного запалення. У зв'язку з вищевказаним, в основу корисної моделі поставлено задачу удосконалити відомий спосіб діагностики АД шляхом визначення системних біомаркерів atopії, що збільшує діагностичну інформативність способу при збереженні високої вірогідності результатів.

Задача, яку поставлено в основу корисної моделі, вирішується тим, що у відомому способі діагностики АД, який включає визначення імунокомпетентних клітин лімфоцитів, інтерлейкінів та їх кількісних значень у вогнищах уражень шкіри, відповідно до корисної моделі, як біоматеріал на дослідженні використовують кров пацієнта, у сироватці якої, крім концентрації субпопуляцій лімфоцитів (CD3, CD4, CD8, CD16, CD19), визначають концентрації імуноглобулінів (IgA, IgE, IgG), інший спектр інтерлейкінів (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10) та вміст гістаміну.

Спосіб виконують наступним чином: при наявності у дитини клініко-анамнестичних ознак АД або при неможливості встановити на основі клініко-анамнестичних критеріїв діагноз АД додатково проводять імунологічне дослідження, яке включає визначення концентрації субпопуляцій лімфоцитів (CD3, CD4, CD8, CD16, CD19), імуноглобулінів (IgA, IgE, IgG), інтерлейкінів (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10) та гістаміну в сироватці крові.

Визначення показників клітинного імунітету проводять методом проточної цитофлюориметрії, визначають рівні концентрації субпопуляцій лімфоцитів CD3 (загальна популяція Т-лімфоцитів), CD4 (Т-лімфоцити хелпери), CD8 (Т-лімфоцити супресори), CD16 (Т-лімфоцити природні кілери), CD19 (В-лімфоцити). Метод ґрунтується на взаємодії моноклональних антитіл (МКАт), мічених флюоресцентною міткою, з поверхневими антигенами виділених лімфоцитів. В пробірку вносять 20 мкл антитіл (CD3, CD4, CD8, CD16, CD19), не торкаючись наконечником стінок пробірки. Зразки перемішують на вортексі та інкубують в темному місці 15-30 хв при кімнатній температурі. Рекомендована кількість лейкоцитів - $3,5-9,4 \cdot 10^9$ /л. Додають до пробірок по 500 мкл буферного розчину. Зразки аналізують на проточному

цитофлюориметрі Epics-XL виробництва Beckman Coulter (США). Встановлено кількість головних імунокомпетентних клітин при АД: $CD3=71,17\pm0,08\%$, $CD4=50,42\pm0,26\%$, $CD8=20,75\pm0,22\%$, $CD16=15,94\pm0,13\%$, $CD19=16,53\pm0,16\%$, імунорегуляторний індекс: $CD4/CD8=2,71\pm0,21$. Практично здорові діти: $CD3=72,40\pm0,11\%$, $CD4=44,43\pm0,18\%$, $CD8=27,98\pm0,19\%$, $CD16=13,13\pm0,08\%$, $CD19=11,89\pm0,13\%$, імунорегуляторний індекс: $CD4/CD8=1,59\pm0,16$.

Вивчають показники гуморального імунітету. Рівні сироваткових імуноглобулінів IgA, IgG визначають методом конкурентного імуоферментного аналізу (ІФА). У лунки планшета з іммобілізованим антигеном (Ig A, G) вносять досліджуваний зразок та кон'югати (анти-IgA, анти-IgG, мічені пероксидазою). IgA, IgG із зразка конкурують з кон'югатами за зв'язок з антигеном на поверхні лунки. Після відмивки активність ферменту, зв'язаного на поверхні лунки планшета, проявляється додаванням субстрату, та вимірюється при довжині хвилі 450 нм. Інтенсивність кольорової реакції зворотно пропорційна кількості IgA, IgG в зразку. Встановлено концентрацію імуноглобулінів при АД: $IgA=1,27\pm0,03$ г/л, $IgG=11,11\pm0,10$ г/л. Практично здорові діти: $IgA=2,21\pm0,03$ г/л, $IgG=8,33\pm0,12$ г/л.

Рівень загального сироваткового IgE вивчають за принципом двосайтового ІФА. У лунку планшета з іммобілізованим антигеном (специфічні aНТН-IgE-антитіла) вносять досліджуваний зразок. IgE загальний із зразка зв'язується з антитілами на поверхні лунки. Незв'язаний матеріал видаляється відмивкою. У лунку вносять кон'югат (другі aНТН-IgE-антитіла, мічені пероксидазою). Після повторної відмивки активність ферменту, зв'язаного на поверхні лунки планшета, проявляється додаванням субстрату, та вимірюється при довжині хвилі 450 нм. Інтенсивність кольорової реакції прямо пропорційна кількості IgE загального у зразку. Встановлено концентрацію IgE при АД: $IgE=421,40\pm151,90$ МО/мл. Практично здорові діти: $IgE=26,10\pm1,96$ МО/мл.

Концентрацію IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 в сироватці крові визначають методом твердофазного ІФА. Специфічні реагенти набору є моноклональними антитілами до IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, сорбовані на поверхні лунок розбірного полістирольного планшета, кон'югат моноклональних антитіл до IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 із пероксидазою і калібровані взірці, які містять вказані інтерлейкіни та інтерферон. На першій стадії аналізу досліджувані та контрольні взірці інкубують в лунках з іммобілізованими антитілами. Наявні у взірцях інтерлейкіни, інтерферон зв'язуються з іммобілізованими антитілами. Зв'язаний IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 взаємодіє при інкубації з кон'югатом антитіл до інтерлейкінів чи інтерферону з пероксидазою. Кількість зв'язаного кон'югату визначають кольоровою реакцією із використанням субстрату пероксидази. Інтенсивність кольорової реакції прямо пропорційна кількості інтерлейкінів, інтерферону у зразку. Встановлено концентрацію інтерлейкінів при АД: $IL-2=3,26\pm0,05$ нг/л, $IL-4=1,84\pm0,07$ нг/л, $IL-6=7,60\pm0,34$ нг/л, $IL-10=9,28\pm0,30$ нг/л. Практично здорові діти: $IL-2=5,78\pm0,14$ нг/л, $IL-4=0,43\pm0,02$ нг/л, $IL-6=2,03\pm0,12$ нг/л, $IL-10=5,33\pm0,10$ нг/л.

Концентрацію гістаміну в сироватці крові визначають методом конкурентного ІФА. У лунки планшета з іммобілізованим антигеном (гістамін) вносять досліджуваний зразок та кон'югати. Гістамін із зразка конкурує з кон'югатами за зв'язок з антигеном на поверхні лунки. Після відмивки активність ферменту, зв'язаного на поверхні лунки планшета, проявляється додаванням субстрату, та вимірюється при довжині хвилі 450 нм. Інтенсивність кольорової реакції зворотно пропорційна кількості гістаміну в зразку. Встановлено концентрацію гістаміну в сироватці крові при АД: гістамін = $3,39\pm0,17$ мкг/л. Практично здорові діти: гістамін = $0,47\pm0,04$ мкг/л.

Позитивний ефект корисної моделі обумовлений тим, що:

розроблено новітню *in vitro* діагностику АД;

ефективна з метою диференціальної діагностики АД;

впровадження корисної моделі підвищить рівень діагностики і профілактики АД.

Ефективність і практичну значущість способу ілюструє наступний приклад його клінічного використання:

Хвора К., 9 років, була госпіталізована зі скаргами на наявність висипки на шкірі, свербіж, порушення сну. З анамнезу відомо, що дівчинка з раннього дитячого віку хворіє тяжкою формою atopічного дерматиту із безперервно рецидивуючим перебігом та резистентністю до терапії. Дитина із родини з обтяженою спадковістю по atopії. Під час обстеження було виявлено еозинофілію периферичної крові 12 %. При імунологічному дослідженні встановлено субпопуляційний склад лімфоцитів: $CD3 - 70,4\%$, $CD4 - 50,1\%$, $CD8 - 20,3\%$, $CD16 - 15,8\%$, $CD19 - 16,4\%$; рівні сироваткових імуноглобулінів: $igA - 1,2$ г/л, $igG - 11,1$ г/л, $igE - 517,5$ МО/мл; цитокіновий профіль: $IL-2 - 3,2$ нг/л, $IL-4 - 1,7$ нг/л, $IL-6 - 7,1$ нг/л, $IL-10 - 9,2$ нг/л; гістамін сироватки: гістамін = $3,4$ мкг/л. Визначено, порушення клітинної ланки імунітету з розвитком

дисбалансу між окремими субпопуляціями лімфоцитів - вірогідне зниження абсолютної та відносної кількості CD₃, одночасно характерним було вірогідне зростання CD₄ при вірогідному зниженні CD₈, імунорегуляторний індекс зростає, вірогідне збільшення кількості CD₁₉, а також збільшення кількості CD₁₆. Відмічено зміни в цитокиновій системі у дітей: зниження IL-2, зростання IL-4, IL-6, IL-10, що залежало від тяжкості перебігу недуги. Аналіз показників гуморальної ланки імунітету у дітей, хворих на АД, показав тенденцію до дисімуноглобулінемії із зниження рівнів IgA, зростання концентрації IgE та IgG, а також гістаміну сироватки крові. Отримані результати підтвердили діагноз АД та виявили порушення системної імунної відповіді, було призначено відповідне лікування.

Таким способом обстежено 140 хворих, з яких АД було підтверджено у 128.

Отже, використання даного способу забезпечує підвищення технологічності дослідження та діагностичну інформативність. Виходячи з позитивних результатів практичного застосування запропонованого способу, доцільно запровадити його використання в практичній діяльності лікувальних закладів.

Джерела інформації:

1. Адаптована клінічна настанова, заснована на доказах: "Атопічний дерматит" /Державний експертний центр МОЗ України. - К., 2016. - С. 112.

2. Пат. № 70021, UA, МПК G01N 33/48. Спосіб діагностики форм атопічного дерматиту у дітей /Клименко В.А., Кожем'яка А.І., Сорокіна І.В.; ХДМУ; № 20031212128, 23.12.2003; Опуб. 15.09.2004, Бюл. № 9. - 3 с.

3. Пат. № 7551, UA, МПК C12Q 1/28, G01N 1/30, G01N 21/00, G01N 33/535, G01N 33/577. Спосіб діагностики атопічного дерматиту у дітей /Клименко В.А., Кожем'яка А.І., Сорокіна І.В.; ХДМУ; № u200500937, 02.02.2005; Опуб. 15.06.2005, Бюл. № 6. - 2 с.

4. Педіатрія - національний підручник /[О.Є. Абатуров, Ю.Г. Антипкін, Г.В. Бекетова, С.О. Крамарев, Майданник В.Г. та ін.] //Під. редакцією В.В. Бережного - К.: Міністерство охорони здоров'я України, асоціація педіатрів України, 2013. - Том 1. - С. 498-519.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб діагностики атопічного дерматиту у дітей шляхом анамнестичного, загально-клінічного обстеження, дослідження клітинної і гуморальної ланок імунітету із визначенням концентрації субпопуляцій лімфоцитів (CD3, CD4, CD8, CD16, CD19) та імуноглобуліну Е (IgE), який **відрізняється** тим, що додатково визначають рівні сироваткових імуноглобулінів (IgA, IgG), інтерлейкінів (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10) та гістаміну в сироватці крові за допомогою тест-систем і при зниженні рівнів IgA, IL-2, підвищенні рівнів IgE, IgG, IL-4, IL-6, IL-10 та гістаміну в сироватці крові достовірно вище норми діагностують атопічний дерматит.

Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601