



УКРАЇНА

(19) UA (11) 12248 (13) U
(51) МПК (2006)
G01N 33/48
A61B 5/1455 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ ВІДНОВЛЕННЯ ВТРАЧЕНИХ ФУНКЦІЙ У ХВОРИХ З НАСЛІДКАМИ ІШЕМІЧНОГО ІНСУЛЬТУ

1

(21) u200509779
(22) 18.10.2005
(24) 16.01.2006
(46) 16.01.2006, Бюл. № 1, 2006 р.
(72) Бровченко Маріанна Станіславівна, Цимбалюк Віталій Іванович
(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ
(57) Спосіб прогнозування відновлення втрачених функцій у хворих з наслідками ішемічного інсульту шляхом обстеження цитокинового статусу, який **відрізняється** тим, що додатково визначають основні субпопуляції лімфоцитів (СД3, СД4, СД8,

2

СД19, СД16, СД54), антиваційні та апоптотичні антигени лімфоцитів (СД25, СД95), рівні фактора некрозу пухлин, інтерлейкіну-1, інтерлейкіну-4, інтерлейкіну-6 і при зниженні лімфоцитів СД4, СД8 від $1,18 \pm 0,13$ і нижче, високому відсотку СД95 від $7,64 \pm 0,68$ і вище прогнозують несприятливе відновлення втрачених функцій, а при факторі 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 підведеному вмісту протизапального інтерлейкіну-4 від $137,02 \pm 9,1$ прогнозують сприятливе відновлення втрачених функцій з наслідками ішемічного інсульту.

Корисна модель відноситься до медицини, а саме до неврології і може бути використана для прогнозування наслідків ішемічного інсульту.

Судинні захворювання головного мозку, через високу розповсюдженість та високий рівень інвалідизації, являють собою одну з найважливіших медичних та соціальних проблем сьогодення. Останнім часом в світі спостерігається зростання кількості цереброваскулярних захворювань. Велику частину серед них займають мозкові інсульти, щорічно вражаючи від 5,6 до 7,0млн. та забираючи життя 4,6млн. людей на планеті. Також актуальна ця проблема і в Україні, де щорічно фіксується 110-130 тисяч інсультів. Смертність від цереброваскулярної патології займає друге місце в структурі загальної смертності населення нашої країни. Аналіз захворюваності на цереброваскулярну патологію в Україні вказує на значний її ріст і вона займає одне із перших місць в Європі. Прослідковується з роками негативна тенденція. Так, якщо в 1991 році було зареєстровано 233 випадки на 100тис. населення, то в 2000 році - 266,3, тобто по відношенню до 1991 року кількість інсультів виросла в 1,6 разів.

Дослідження останніх років значно розширили, а в більшості змінили бачення про закономірності мозкового кровообігу в нормі і патології, розкрили конкретні механізми різних форм судинних ура-

жень головного і спинного мозку [1, 2, 3]. Проте вивчені ще не всі механізми розвитку гострих ішемічних порушень мозкового кровообігу. Своєчасність вирішення питання про вибір тактики лікування таких хворих забезпечує попередження ускладнень і покращення якості життя пацієнтів. У зв'язку з тим зрозумілий інтерес до вивчення у хворих на ішемічний інсульт прогностичного значення показників і формування однорідних за прогнозом груп пацієнтів.

Відомий спосіб прогнозування відновлення втрачених функцій у хворих з наслідками ішемічного інсульту запропонований шведськими вченими [4] шляхом визначення кількості мононуклеарних клітин з експресією IL-8, IL-1B та IL-17 в СМР та плазмі, при якому оцінюють ступінь вираженості неврологічного дефіциту та кореляцію ($P < 0,01$) з вмістом вказаних цитокинів. Ступінь неврологічного ушкодження встановлювався у всіх хворих з ішемічним інсультом відповідно до Скандинавської шкали інсультів на початку та при подальших обстеженнях. Величини СШІ знаходились в діапазоні від 8 до 58 балів. При високому ступені неврологічного ушкодження (низькій кількості балів за СШІ) хворі мали високе число мононуклеарних клітин з експресією IL-8, IL -1B та IL-17. Даний метод прогнозування має обмеження, тому що ця зворотня кореляція залишалась значущою тільки для IL-8.

(19) UA (11) 12248 (13) U

Решта показників вже через 31 добу не відрізнялись від значень у здорових осіб контрольної групи. Таким чином визначити довготривалий прогноз за допомогою цього методу неможливо.

Найбільш близьким до запропонованого способу є спосіб визначення прозапальних цитокінів IL-6 та ФНП в плазмі та СМР пацієнтів з ішемічним інсультом та зв'язок з раннім неврологічним погіршенням [7]. Автори проаналізували результати обстеження цитокінового статусу у 231 пацієнта з ішемічним інсультом. Наявність неврологічного погіршення визначалась при зниженні хоча б на один бал за Канадською шкалою оцінки інсульту протягом перших 48 годин. Вісімдесят три пацієнти (35,9%) мали погіршення стану протягом перших 48 годин. Рівні IL-6 у плазмі ($>21,5$ пг/мл) та в СМР ($>6,3$ пг/мл) були незалежними факторами раннього клінічного погіршення у хворих з ішемічним інсультом. Зв'язок зберігав статистичну достовірність для всіх підтипів ішемічного інсульту, а також для всіх осіб з корковими та підкорковими інфарктами. Існуючий метод прогнозування має суттєве обмеження, яке пов'язане з тим, що використовується лише один критерій, що знижує точність прогнозування. Також не визначені предиктори, які визначають подальший прогноз перебігу ішемічного інсульту. Недоліком даного способу є відсутність дослідження процесів активації та апоптозу в лімфоцитах хворих, що могло б значно підвищити точність прогнозу.

Дослідженнями останнього часу встановлений 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 зрушень функції імунної системи, розвитку аутоімунних реакцій до антигенів мозку, і таким чином впливати на перебіг ішемічного інсульту [5, 6]. Незважаючи на суттєві успіхи у вивченні патологічних процесів, що призводять до зрушень функції імунної системи при ішемічному інсульті, послідовність їх виникнення, взаємозв'язок та вплив на перебіг реабілітаційного періоду потребують уточнення.

В основі корисної моделі поставлена задача удосконалення способу прогнозування наслідків ішемічного інсульту, в якому за рахунок виявлення характерних критеріїв при проведенні обстеження цитокіно-імунного статусу, а саме визначення в крові основних субпопуляцій лімфоцитів (CD3, CD4, CD8, CD19, CD16, CD54) за допомогою моноклональних антитіл, визначення активаційних та апоптотичних антигенів лімфоцитів (CD25, CD95) методом проточної цитофлюориметрії та визначення методом імуноферментного аналізу рівнів фактору некрозу пухлин, інтерлейкіну-1, інтерлейкіну-4, інтерлейкіну-6, досягається можливість більш точного прогнозування наслідків ішемічного інсульту.

Технічний результат, отриманий від вирішення поставленої задачі буде полягати у чіткому визначенні найближчого прогнозу, що сприятиме своє-

часному вибору відповідної тактики лікування хворих з наслідками ішемічного інсульту, попередженню ускладнень та покращенню якості життя пацієнтів.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі прогнозування наслідків ішемічного інсульту шляхом обстеження цитокіно-імунного статусу, відповідно до корисної моделі оцінюють показники CD3, CD4, CD8, CD19, CD16, CD54, CD25, CD95 та рівні фактору некрозу пухлин, інтерлейкіну-1, інтерлейкіну-4, інтерлейкіну-6, які характеризують вираженість запальних процесів та ступінь нейроімунних порушень. У хворих з вираженим неврологічним дефіцитом спостерігалось достовірне зниження імунорегуляторного показника (CD4/CD8 лімфоцити) $1,18 \pm 0,13$ і нижче, що може бути одним із несприятливих прогностичних критеріїв. Високий відсоток CD95 лімфоцитів, що свідчить про підвищену готовність до апоптозу імуннокомпетентних клітин, а саме $7,64 \pm 0,68$ і вище, також є несприятливим імунологічним критерієм перебігу відновлюваного періоду у хворих з наслідками ішемічного інсульту.

Нормальний вміст прозапальних цитокінів: фактору некрозу пухлин ($52,02 \pm 4,7$), інтерлейкіну-1 ($45,02 \pm 4,6$), інтерлейкіну - 6 ($7,0 \pm 0,96$), та підвищений вміст протизапального інтерлейкіну-4 (до $137,02 \pm 9,1$ і вище), який дозволяє "загасити" локальне вогнище запалення, є сприятливим прогностичним критерієм перебігу відновлюваного періоду у хворих з наслідками ішемічного інсульту.

Підвищений вміст інтерлейкіну-6 ($18,25 \pm 2,2$ і вище) свідчить про максимальну активність запальних реакцій, і є несприятливим прогностичним критерієм перебігу відновлюваного періоду у хворих з наслідками ішемічного інсульту. Спосіб здійснюється наступним чином:

У дослідженні брали участь 48 пацієнтів віком від 40 до 65 років з наслідками ішемічного інсульту в різні періоди хвороби, під час проведення реабілітаційного лікування, та 25 практично здорових осіб контрольної групи. Всі обстежувані були пацієнтами неврологічного відділення та міського центру нейрореабілітації Київської міської клінічної лікарні №18.

Діагноз будувався на клінічному анамнезі, обстеженні неврологічного статусу та КТ або МРТ головного мозку. У всіх пацієнтів під час проведення КТ або МРТ дослідження було виявлено ознаки ішемічних уражень різної локалізації та розмірів. Хворі з нещодавно перенесеною інфекцією в анамнезі, з серцевими, нирковими, печінковими, аутоімунними, онкологічними, ендокринними та іншими соматичними захворюваннями, до обстеження пацієнти з повторними порушеннями мозкового кровообігу та ті, що перенесли черепно-мозкову травму. В усіх хворих проводився контроль звичайних стандартних показників крові. Жоден хворий не мав підвищення кількості лейкоцитів, не було також, змін показників цукру крові та біохімічних показників. Кожному хворому двічі на день проводилась термометрія (відхилень від нормальних показників у жодного пацієнта зафіксовано не було).

Ступінь порушень неврологічного статусу оці-

новався за шкалами Бартела та чотирьохбальної оцінки в день госпіталізації та кожні 10 днів перебування в стаціонарі. Пацієнтам проводилось нейроімунологічне обстеження шляхом визначення основних субпопуляцій лімфоцитів (CD3, CD4, CD8, CD19, CD16, CD54) за допомогою моноклональних антитіл, визначення активаційних та апоптотичних антигенів лімфоцитів (CD25, CD95) методом проточної цитофлюориметрії, визначення методом імуноферментного аналізу рівнів фактору некрозу пухлин, інтерлейкіну-1, інтерлейкіну-4, інтерлейкіну-6. Безпечність методу та відсутність будь-яких навантажень на пацієнта дозволяє проводити обстеження в різні реабілітаційні періоди та пацієнтам зі значним порушенням функцій.

Імунологічне обстеження включало в себе кількісну оцінку різних субпопуляцій лімфоцитів непрямым імунофлюоресцентним методом за допомогою моноклональних антитіл виробництва ЗАТ «Сорбент-сервіс» (Москва), а також вивчення цитокінпродукуючої функції імунокомпетентних клітин крові за допомогою визначення продукції ІФН- γ та ФНП- α імуноферментним методом з використанням наборів для ІФА виробництва ТОВ «Протейновий контур» (Санкт-Петербург, Росія).

Всіх обстежуваних було розподілено в залежності від вираженості неврологічного дефіциту на 4 групи. Ступінь порушень неврологічного статусу оцінювався за шкалами Бартела та чотирьохбальної

оцінки в день госпіталізації та кожні 10 днів перебування в стаціонарі. При використанні шкали Бартела, оцінка рівня побутової активності проводилась по сумі балів пацієнта за кожним із розділів тесту. Максимальна сума балів, що відповідає повній незалежності у повсякденному житті дорівнює 100 балів. За шкалою чотирьохбальної оцінки вираховується ступінь порушень неврологічного статусу. Виражений ступінь 7-13 балів, помірний - 14-20 балів, легкий - 21-27 балів та 28 балів - порушень немає.

Показники клітинного імунітету у хворих з помірними та вираженими неврологічними порушеннями у відновлювальному періоді не мали між собою вірогідних відмінностей. Для обох цих груп хворих була характерною збережена кількість Т, та, NK-клітин наявний В-лімфоцитоз. В той же час, спостерігалось достовірне зниження імунорегуляторного показника (CD4/CD8 лімфоцити), що може бути одним із несприятливих прогностичних критеріїв. Для хворих з вираженим неврологічним дефіцитом був характерним високий відсоток CD95⁺ лімфоцитів, що свідчить про підвищену готовність до апоптозу імунокомпетентних клітин. Це, на наш погляд, також можна вважати поряд з В-лімфоцитозом, за несприятливими імунологічними критеріями перебігу відновлюваного періоду у постінсультних хворих.

Таблиця

Вміст популяцій та субпопуляцій лімфоцитів у постінсультних хворих залежно від ступеня неврологічного дефіциту (M \pm m)

Показник	Хворі зі ступенем F ₁ (n=9)	Хворі зі ступенем F ₂ (n=17)	Хворі зі ступенем F ₃ (n=14)	Хворі зі ступенем F ₄ (n=8)	Хворі зі ступенем (n=25)
Лейкоцити $\times 10^9/l$	5,8 \pm 0,44	6,23 \pm 0,49	6,13 \pm 0,43	5,97 \pm 0,51	6,96 \pm 0,72
Лімфоцити, %	33,00 \pm 3,2	30,12 \pm 3,5	27,29 \pm 3,1	29,50 \pm 3,2	31,64 \pm 3,89
CD3 ⁺ лімф., %	79,40 \pm 6,2*	65,77 \pm 6,1	65,92 \pm 5,9	64,75 \pm 6,2	64,86 \pm 5,91
CD4 ⁺ лімф., %	37,95 \pm 2,9	34,66 \pm 2,7	31,50 \pm 2,6	32,01 \pm 2,5	32,33 \pm 3,81
CD8 ⁺ лімф., %	24,10 \pm 2,35	22,30 \pm 2,11	26,66 \pm 2,7	25,94 \pm 2,3	21,52 \pm 2,01
CD4/CD8	1,59 \pm 0,16	1,56 \pm 0,16	1,18 \pm 0,13*	1,23 \pm 0,12	1,61 \pm 0,19
CD19 ⁺ лімф., %	3,20 \pm 0,29*	9,46 \pm 0,95	12,19 \pm 1,3*	11,59 \pm 1,3*	7,85 \pm 1,04
CD16 ⁺ лімф., %	8,90 \pm 0,91*	11,85 \pm 1,13*	15,92 \pm 1,12	14,41 \pm 1,13	17,10 \pm 1,95
CD25 ⁺ лімф., %	3,35 \pm 0,34 ^x	9,46 \pm 0,89 ^x	12,19 \pm 1,14	11,59 \pm 1,13	12,30 \pm 1,17
CD54 ⁺ лімф., %	5,20 \pm 0,51 ^x	5,70 \pm 0,49 ^x	6,89 \pm 0,71 ^x	6,29 \pm 0,59 ^x	11,10 \pm 1,65
CD95 ⁺ лімф., %	4,30 \pm 0,39	5,83 \pm 0,55 ^x	7,64 \pm 0,68 ^x	7,23 \pm 0,71 ^x	3,32 \pm 0,34

Примітки: * - вірогідність різниці показника з контрольною групою (p<0,01), n - кількість хворих.

Проведений аналіз літературних джерел та виявлені порушення в клітинній ланці імунітету у хворих з різним ступенем неврологічних порушень, спонукало нас додатково вивчити питання про функцію імунокомпетентних клітин на основі син-

тезу про- та протизапальних цитокінів, з метою виведення більш точних критеріїв прогнозування поновлення втрачених функцій після ішемічного інсульту.

Таблиця

Вміст у сироватці крові хворих, які перенесли ішемічний інсульт, про - та протизапальних цитокінів залежно від наявності неврологічних порушень (м±m)

Показник	Хворі з F1- ступенем (n=9)	Хворі з F2- ступенем (n=17)	Хворі з F3- ступенем (n=14)	Хворі з F4- ступенем (n=8)	Контрольна група (n=25)
ФНП-α, п ² /мл	52,02±4,7	67,24±6,8* p2	69,71±7,1*	94,50±8,3*	42,31±4,9
ІЛ-1β, п ² /мл	45,02±4,6	62,71±6,3* p2	68,36±7,2*	106,88±10,5* p4	39,42±4,52
ІЛ-6, п ² /мл	7,0±0,96	9,65±1,1	10,93±1,4	18,25±2,2* p4	10,31±2,3
ІЛ-4, п ² /мл	137,02±9,1*	86,53±8,9* p2	62,71±6,4* p3	64,75±6,6*	25,42±3,3

Примітки: * - Вірогідність різниці показника з контрольною групою ($p_1 < 0,01$)

p 2 - вірогідність різниці показника у хворих з F1 і F2

p 3 - вірогідність різниці показника у хворих F2 і F3;

p4 - вірогідність різниці показника у хворих з F3 і F4.

Показники несприятливого прогнозу у хворих з наслідками ішемічного інсульту є:

1. Достовірне зниження імунорегуляторного показника (CD4/CD8 лімфоцити) $1,18 \pm 0,13$ і нижче.

2. Високий відсоток CD95 лімфоцитів, що свідчить про підвищену і готовність до апоптозу імунотетентних клітин, а саме $7,64 \pm 0,68$ і вище.

3. Підвищений вміст інтерлейкіну-6 ($18,25 \pm 2,2$ і вище) свідчить про максималну активність запальних реакцій, і є несприятливим прогностичним критерієм перебігу відновлюваного періоду у хворих з наслідками ішемічного інсульту.

Показники сприятливого прогнозу у хворих з наслідками ішемічного інсульту є:

1. Нормальний вміст прозапальних цитокінів: фактору некрозу пухлин ($52,02 \pm 4,7$), інтерлейкіну-1 ($45,02 \pm 4,6$), інтерлейкіну - 6 ($7,0 \pm 0,96$), та підвищений вміст протизапального інтерлейкіну-4 (до $137,02 \pm 9,1$ і вище), який дозволяє "загасити" локальне вогнище запалення, є сприятливими прогностичними критеріями перебігу відновлюваного періоду у хворих з наслідками ішемічного інсульту.

В запропонованому способі використовується поєднання клінічних та імунологічних критеріїв, що сприяє підвищенню інформативності прогнозування. Даний спосіб значно підвищує точність прогнозу, і, як результат дозволяє покращити лікування хворих з наслідками ішемічних інсультів. Ефективність методу доведена дослідженнями у відділенні неврології та міському центрі нейрореабілітації КМКЛ №18.

Приклади застосування запропонованого способу прогнозування наслідків ішемічного інсульту наведеш нижче.

Хворий Остапеч М.І., 1950 року народження, поступив в неврологічне відділення КМКЛ №18 з діагнозом ЦВХ: Стан після перенесеного порушення мозкового кровообігу за типом ішемії у вигляді глибокого правостороннього геміпарезу, сенсо-моторної афазії, з порушенням функції ходи та самообслуговування. Ранній реабілітаційний період. Повільний темп поновлення втрачених функцій. За шкалою чотирьохбальної оцінки при поступленні у хворого 12 балів. Хворий отримувал адекватний комплекс відновної терапії, а саме актовегін $5,0 \text{ в\л}$ №10, мілдронат $5,0 \text{ в\л}$ №10, міль

гама $2,0 \text{ в\л}$ №10, прозерін $1,0 \text{ в\л}$ №10, масаж, ЛФК. За даними нейроімунологічного обстеження у хворого було виявлено такі показники: CD4/CD8-0,43, CD95-10,0%, Інтерлейкін-6-30пг/мл, Інтерлейкін - 4-130пг/мл. За даними наших досліджень ці показники були несприятливими прогностичними критеріями. Незважаючи на повний об'єм відновного лікування стан хворого значно не покращився (при виписці - 13 балів) незважаючи на відносно молодий вік та ранній реабілітаційний період.

Форостяная С.П., 1967р.н., поступила в неврологічне відділення КМКЛ №18 з діагнозом ЦВХ: Стан після перенесеного порушення мозкового кровообігу за типом ішемії у вигляді помірного правостороннього геміпарезу елементів моторної афазії. Ранній реабілітаційний період. Швидкий темп поновлення втрачених функцій. За шкалою чотирьохбальної оцінки при поступленні у хворого 20 балів. Хвора отримувала адекватний комплекс відновної терапії, а саме актовегін $5,0 \text{ в\л}$ №10, мілдронат $5,0 \text{ в\л}$ №10, міль гама $2,0 \text{ в\л}$ №10, прозерін $1,0 \text{ в\л}$ №10, масаж, ЛФК. За даними нейроімунологічного обстеження у хворої було виявлено такі показники: CD4/CD8-2,1, CD95-9,4%, Інтерлейкін-6-6пг/мл, Інтерлейкін-4-180пг/мл. За даними наших досліджень ці показники були сприятливими прогностичними критеріями. За період відновного лікування в стаціонарі стан хворої значно покращився (при виписці - 26 балів).

Наведені приклади підтверджують надійність даного способу прогнозування наслідків ішемічного інсульту. Таким чином, запропонований спосіб прогнозування за допомогою нейроімунологічного дослідження доцільно проводити хворим з наслідками ішемічного інсульту, особливо зі значним неврологічним дефіцитом, а також хворим молодого працездатного віку з метою визначення прогнозу поновлення втрачених функцій.

Література.

1. Зозуля І.С., Боброва В.І. Ішемічний інсульт: епідеміологія і шляхи зниження смертності // Мед. новості. - 1998. - №4. - С.7-8.

2. Зозуля І.С., Поліщук Л.А., Синицький С.І. Прогнозування розвитку ішемічного інсульту зі зворотнім та незворотнім дефіцитом // Актуальні

проблеми надання екстренної медичної допомоги при невідкладних станах: Матеріали. - К., - 1995. - С.79-80.

3. Гусев Е.И., Скворцова В.И., Изыкенова Г.А. и др. Изучение уровня аутоантител к глутаматным рецепторам в сыворотке крови у больных в остром периоде ишемического инсульта // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. - 1996. - Т.96, №5. - С.68-72.

4. Kostulas N., Pelidou H., Kivisakk P., Kostulas V., Link H. Increased IL-1, IL-8 and IL-17 mRNA expression in Blood Mononuclear cells observed in a prospective ischemic stroke study // Stroke/1999. -

V.30, №10 - P.2174-2179.

5. Лысяный Н.И. и соавторы. Иммунная система головного мозга // Киев: «ВИПОЛ». - 1999. - 216 с.

6. Лысяный Н.И. Нейроиммунные взаимоотношения, их значение для неврологии // Український вісник психоневрології. - Харків. - 1996. - т. №4, вил. 5/12/. - С.423-425.

7. Vila N, Castillo J, Davalos A, Chamorro A. Proinflammatory cytokines and early neurological worsening in ischemic stroke// Stroke. 2000 - V.31, №10, - P.2325-2329.