



УКРАЇНА

(19) UA (11) 36549 (13) U
(51) МПК (2006)
G01N 33/48
G01N 33/53
A61B 10/02

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ РЕМОДЕЛІНГУ БРОНХІВ НА ТЛІ ХРОНІЧНОГО ТА РЕЦИДИВУЮЧОГО БРОНХІТУ

1

(21) u200808141

(22) 17.06.2008

(24) 27.10.2008

(46) 27.10.2008, Бюл.№ 20, 2008 р.

(72) ІЛЬЧЕНКО СВІТЛАНА ІВАНІВНА, UA, БОН-ДАРЕВА ВАЛЕНТИНА ОЛЕКСАНДРІВНА, UA

(73) ІЛЬЧЕНКО СВІТЛАНА ІВАНІВНА, UA, БОН-ДАРЕВА ВАЛЕНТИНА ОЛЕКСАНДРІВНА, UA

(57) Спосіб прогнозування ремоделінгу бронхів на тлі хронічного та рецидивуючого бронхіту, що включає браш-біопсію слизуватої оболонки бронхів, імуноцитохімічне дослідження аналізату, оцінку даних та формування висновку, який **відрізняється** тим, що додатково аналізат піддають роздільному титруванню, з використанням монок-

2

лональних антитіл TGF- β , 34 β E12, Ki-67 і стеклол, інкубують при T 25-30°C протягом 30хв., промивають титри, послідовно покривають шарами діамінобензидину, гематоксиліну, визначають рівні експресії моноклональних антитіл у кожному з титрів, оцінюють реакції взаємодії антитіл і антигенів, а при формуванні висновку, на основі залежності фіброзу бронхіальної стінки від виснаження проліферативного ресурсу і клітинної метаплазії бронхіального епітелію, прогнозують високий ризик патогенезу ремоделінгу, якщо значення експресії TGF- β і 34 β E12 або Ki-67 перевищують рівні експресій їм відповідних нормалей.

Корисна модель відноситься до медицини, зокрема до досліджень або аналізу біологічних матеріалів імуноцитохімічним шляхом, до застосування матеріалів, які утримують антигени або антитіла, до біопсії та може бути використаною в дитячий пульмонології.

З науково-технічних повідомлень встановлено, що ремоделінг, як процес морфологічної перебудови бронхів, піддається прогнозуванню на основі морфологічної оцінки тканин епітелію бронхіального дерева, відділених у вигляді зрізів [1]. Недолік цієї методики зв'язується з інвазивним і травматичним характером отримання біоптату, що істотно обмежує її використання в дитячий пульмонології.

Відомий спосіб прогнозування розвитку бронхіальної обструкції на тлі хронічного бронхіту, котрий характеризується відбором аналізату з бронхіального дерева у вигляді відмитої рідини, а також проб венозної крові та слини, визначення в сироватці крові концентрації ІЛ-1 та оцінку критеріїв ризику порушень бронхіальної прохідності на основі значень концентрації ІЛ-1 [2]. З практичної точки зору це допускає прогнозування бронхіальної обструкції на основі звуження бронхів, за наявності необоротних зкупчень слизу і мокротиння, як непрямих ознак ремоделінгу. Натомість, очевидно, що виключення забору біоптату знижує травми-

чність, але при цьому зберігається ризик інфекування, з-поза необхідності взяття венозної крові, а відбір бронхоальвеолярної рідини шляхом змивання з бронхіального дерева, наприклад за допомогою лаважу, є не досить стерпною процедурою, що стримує використання способу в дитячий пульмонології також.

Більш наближеним до дійсної корисної моделі за найбільшою кількістю істотних ознак є спосіб прогнозування ремоделінгу бронхів на тлі хронічного та рецидивуючого бронхіту, що включає браш-біопсію слизуватої бронхів, імуноцитохімічне, морфологічне дослідження аналізату, оцінку його дистрофії та апоптозу для формування висновку [3]. За цих умов поліпшуються інвазивні характеристики об'єкта, оскільки виключається відбір венозної крові, а браш-біопсія зводиться до отримання відбитків слизуватої бронхів зі збереженням цілісності її тканин, що допускає його застосування у дитячий пульмонології. Але, прототипу ще бракує прийнятної чутливості до процесу морфологічної перебудови бронхів. Вірогідніше за все, це зумовлене недостатком достовірних предикторів фіброзу або специфічності і замалою інформативністю базових критеріїв.

До основи дійсної корисної моделі поставлена задача доопрацювати спосіб прогнозування ремо-

UA (11) 36549 (13) U

делінгу бронхів на тлі хронічного та рецидивуючого бронхіту, використання якого дозволило б шляхом проведення реакцій моноклональних антитіл з антигенами розширити інформативність, а відтак збільшити чутливість до морфологічної перебудови бронхів у дітей.

Поставлена задача вирішується тим, що при використанні в способі прогнозування ремоделінгу бронхів на тлі хронічного та рецидивуючого бронхіту, що включає браш-біопсію слизоватої оболонки бронхів, імуноцитохімічне дослідження аналізату, оцінку даних та формування висновку, відповідно до корисної моделі, додатково аналізат піддають роздільному титруванню, з використанням моноклональних антитіл TGF- β , 34 β E12, Ki-67 і стеклов, інкубують при T 25-30° протягом 30хв., промивають титри, послідовно покривають шарами діамінобензидину, гематоксиліну, визначають рівні експресії моноклональних антитіл у кожному з титрів, оцінюють реакції взаємодії антитіл і антигенів, а при формуванні висновку, на основі залежності фіброзу бронхіальної стінки від виснаження проліферативного ресурсу і клітинної метаплазії бронхіального епітелію, прогнозують високий ризик патогенезу ремоделінгу, якщо значення експресій TGF- β і 34 β E12 або Ki-67 перевищують рівні експресій їм відповідних нормалей.

Причинно-наслідковий зв'язок сукупності відмітних ознак дійсного способу зі збільшенням чутливості дослідження до ремоделінгу бронхів у дітей полягає в наступному.

TGF- β є регуляторним поліпептидом, ліофілізатом NCL-TGF- β і універсальним маркером трансформації фактору росту антигенів, що впливає на синтез компонентів екстрацелюлярного матриксу, кооперацію клітин запалення, насамперед, макрофагів і добре корелює з патогенезом ремоделінгу та імунною системою за рахунок інгібуючих властивостей. Поряд із цим, він допускає перемикання ізотипів імуноглобулінів, а разом з МУЛ-2 у 10^X підвищує синтез J γ , білків міжклітинного матриксу, колагену, стимулює проліферацію фібробластів, нейтрофілів, активує утворення сполучних тканин, судин, процеси гістоморфологічної обструктивної перебудови бронхів.

Інформативність TGF- β була добре висвітлена в способі ранньої діагностики процесів ремоделінгу бронхів при хронічній обструктивній хворобі легень у дорослих, де досліджувалась його концентрація у слині чоловіка [4]. Проте, відсутність у TGF- β органоспецифічних здібностей і залежність функцій від концентрації в слині під впливом небронхогенних факторів, при його ізольованому, окремому використанні може викривляти прогнозування ремоделінгу бронхів.

Моноклон 34 β E12 володіє високою молекулярною масою, а як антитіло до цитокератинів і маркер плоскоклітинної метаплазії, дозволяє достовірно контролювати процес морфологічної перебудови бронхів.

Це зумовлене тим, що зміна структури бронхів відбувається набагато раніше, ніж зміна функціональних показників функції зовнішнього подиху, а скупчення лімфоїдної тканини у слизоватих гортані, трахеї та бронхів, асоціюється з бронхами, їх

мукозальними епітеліоцитами, з можливістю посилення секреції цитокінів, інгібіторів протизапальних агентів і молекул головного комплексу гістосумісності міжклітинних взаємодій. Перелік цитокінів, секретованих цими клітками, включає інтерлейкіни, що значно задіяні в активізації запальних процесів респіраторного тракту, у т.ч. в проліферації фібробластів і структурних змінах бронхових стінок. Така морфологічна перебудова стінок бронху відбиває патогенез хронічного, рецидивуючого бронхіту, складає основу патогенезу хронічного, рецидивуючого бронхітів і призводить до обструкції дихальних шляхів.

Ki-67 є моноклональним антитілом, залученим як маркер проліферативного потенціалу бронхіального епітелію. Раніш маркерні властивості Ki-67 знайшли підтвердження в способі прогнозування перебігу метастазування увеальної меланоми, де зв'язувались з оцінкою патологічної активності онко-білків [5].

Залучення TGF- β як антитіл до β -фракції епітелію, 34 β E12 як антитіл до цитокератинів і Ki-67 як маркера проліферативного потенціалу бронхіального епітелію, обґрунтоване високою продуктивністю реакцій антитіл з антигенами та прийнятною чутливістю до ремоделінгу бронхіальної стінки. Достовірність останніх доведена клініко-анамнестичними дослідженнями, даними візуалізації ендобронхоскопічних картин, спірометрії, аналізом імуноцитохімічних ознак метаплазії, а також репараційних потенціалів на тлі перебігу хронічного та рецидивуючого бронхіту у дітей. Комплексна взаємодія TGF- β , 34 β E12 і Ki-67 відбиває залежність фіброзу бронхіальної стінки від виснаження проліферативного ресурсу та клітинної метаплазії бронхіального епітелію.

Інкубація стеклов в камерах при T 25-30° на протязі 30хв. нормалізує реакцію антитіл до антигенів, що разом з оптимізацією її технологічних режимів, зумовлює виявлення активності патологічної ланки та сприяє можливості здійснення її кількісної оцінки.

Промивання, нанесення на стекла діамінобензидину забезпечує ідентифікацію реакцій антитіл і антигенів, візуалізацію їхньої взаємодії за допомогою мікроскопа, структур різних елементів, рецепторів, продуктів синтезу клітин або екстрацелюлярного матриксу за певними змінами кольору, розподілом міток в ядрі або мембрані. Завдяки імуноспецифічності діамінобензидину (хромогену DAB) до шуканих антитіл і утримувannya достатньої кількості молекул пероксидази, більшає чутливість до ремоделінгу бронхів. Додаткове офарблення титрів гематоксиліном дозволяє диференціювати структури аналізату, що у сукупності з промиванням і нанесенням діамінобензидину збільшує кількість інформаційних ознак, а від того посилює чутливість до ремоделінгу. Оцінка реакцій антитіл та активності аналізату титриметричним чином ґрунтується на кількісному аналізі, що ґрунтується на вимірі експресій застосовуваних маркерів. При цьому кінцеві крапки титрування знаходять по відхиленню рівнів експресій TGF- β , 34 β E12, Ki-67, відносно їхніх нормалей, притаманних здоровим дітям. Застосування експресії мар-

керів TGF- β та Ki-67 або 34 β E12 відбиває залежності фіброзу бронхіальної стінки від виснаження проліферативного ресурсу та клітинної метаплазії бронхіального епітелію, що на відміну від прототипу, дозволяє формувати більш достовірні прогностичні висновки, щодо виникнення високого ризику ремоделінгу, з розвитком необоротних порушень прохідності бронхів на тлі хронічних і рецидивуючих форм бронхітів. У порівнянні з прототипом, використання запропонованого рішення задачі у наданому вигляді сприяє підвищенню точності кінцевого результату, майже у 2,8-3 рази. Тож, сукупність ознак способу прогнозування ремоделінгу бронхів на тлі хронічного та рецидивуючого бронхіту є суттєвою та відповідає критерію «новизна», оскільки має причинно-наслідковий зв'язок з отриманням вищезазначеного технічного результату та не випливає з досліджуваного рівня техніки явним чином.

Відомості, котрі підтверджують можливість відтворення способу прогнозування ремоделінгу бронхів на тлі хронічного та рецидивуючого бронхіту, з можливістю перевернення вищезазначеного технічного результату і його «промислової придатності» полягають в наступному.

На мал.1, 2 надані зображення цитоплазматичних реакцій мембран на TGF- β і 34 β E12, відповідно, при 1000 \times збільшенні мікроскопа.

Для здійснення способу прогнозування ремоделінгу бронхів на тлі хронічного та рецидивуючого бронхіту, що призводить до виникнення необоротних порушень їхньої прохідності у дитячому віці як антитіла залучають моноклон 34 β E12 з високою молекулярною масою фірми «DakoCytomation» (Данія), TGF- β з молекулярною масою -25кДа «NovoCastr» (Швеція), маркер Ki-67 (клон MIB-1) «DakoCytomation», адгезивну рідину «SuperFrost Plus» (Данія), розчинник антитіл «Antibody Diluent» і RTU «Ready-To-Use» (Швеція), ТРИС-буферний розчин, діамінобензидин (хромоген, «DAB»), гематоксилін Майєра, бальзам, лабораторні стекла.

Сутність. У дітей, наприклад, з повторними тяжкими інфекційними та хронічними бронхітами, в період клінічної ремісії, проводять браш-біопсію слизової оболонки бронхів, в результаті котрої отримують аналізат, у вигляді відбитка останньої без порушення цілісності та піддають його імуноцитохімічному дослідженню. При цьому, імуноцитохімічне дослідження ґрунтується на специфічній взаємодії моноклональних антитіл та антигенів в умовах титрування моноклональними антитілами TGF- β , 34 β E12 і Ki-67.

Особливістю проведення якісних специфічних реакцій є дотримання до регламенту виготовлення титрів, з урахуванням індивідуальних особливостей кожного з маркерів. Для цього лабораторні стекла оброблюють адгезивною рідиною «SuperFrost Plus», використовуючі ендоскопічну щітку, а потім наносять на них залучені субстанції. Перед цим моноклональні антитіла TGF до β -фракції епітелію і маркер проліферативного потенціалу бронхіального епітелію Ki-67 розчинюють за допомогою «Antibody Diluent», при співвідношеннях 1:350 і 1:150, відповідно, а 34 β E12 послабляють RTU-розчином, у співвідношенні 1:300. Титри

інкубують у камерах, при Т 25-30° на протязі 30хв, а надалі промивають ТРИС-буферним розчином. Для ідентифікації реакцій, стекла покривають шаром діамінобензидину, в умовах мікроскопічного контролю, при 1000 \times збільшенні, протягом 0,5-3хв. При цьому, завершення реакції оцінюється за коричневими відтінками титрів, розподілом міток в ядрі або на мембрані, у залежності від локалізації шуканих структур, локалізацією антигенних детермінант цитокератинів, плескатих епітеліїв 34 β E12 і TGF- β на мембрані й субмембранним чином у цитоплазмі, а Ki-67 - за інтрануклеарним розподілом (див. мал.1, 2). Для здійснення якісної диференцівки аналізату стекла з нанесеним аналізатом додатково офарблюють гематоксиліном Майєра, затрачаючи на це 1-3хв. Потім здійснюють дегідратацію, бальзамування матеріалів, відповідно до стандартів. Вимірюють експресію моноклональних антитіл TGF, 34 β E12 і Ki-67 і оцінюють реакції по кожному склу. Оцінка результатів імуноцитохімічної реакції здійснювалась за допомогою методів, прийнятих в імуногістохімії: якісно з визначенням ступеня експресії в балах (по інтенсивності забарвлення) та кількісно в відсотках за співвідношенням до переглянутих клітин. Частота виявлення позитивних експресій вивчаємих маркерів у групі здорових дітей складає : Ki-67- більше 10од. на 100 епітеліальних клітин, 34 β E12 - нижче 15 од., експресія TGF- β у бронхіальному епітелії відсутня. При цьому прогнозують високий ризик патогенезу ремоделінгу, коли виявляють перевищення експресії TGF- β та Ki-67 або 34 β E12, відносно визначених нормалей, приймаючи до уваги залежність фіброзу бронхіальної стінки від виснаження проліферативного ресурсу, а також клітинної метаплазії бронхіального епітелію.

За сукупністю пропонованих умов досягається підвищення точності прогнозування у 2,8-3рази.

Рестроспекція історій хвороб дітей, перехворілих раніш на хронічний та рецидивуючий бронхіт, насамперед, клініко-анамнестичних даних, спірометричних показників і результатів узагальнення ендобронхоскопічних картин дозволяє кваліфікувати вищезазначені антитіла достовірними маркерами і спроможними до предикції ремоделінгу та формування необоротної бронхообструкції.

Проведені імуноцитохімічні дослідження дозволили встановити, що в групі дітей з хронічними бронхітами (наявність вираженого порушення архітекtonіки бронхів) проліферативний потенціал епітелію був нижчим, відносно рецидивуючого бронхіту (позитив Ki-67 становив серед них 3,57 \pm 0,03, проти 4,5 \pm 0,01 на 100 клітин, відповідно). Експресія антигенної детермінанти 34 β E12 у дітей обох груп була майже однаковою, хоча при рецидивуючому бронхіті позитивна реакція часто спостерігалась одночасно як з плескати́м так і залозистим епітелієм, що свідчило про зворотну трансформацію епітелію. У третини з обстежених дітей у бронхіальному епітелії ідентифікували TGF- β . Вірогідної різниці по частоті виявлення цього маркеру між двома групами не визначали, але знайшли пряму кореляцію з такими анамнестичними характеристиками, як наявність хронічного бронхолегеневого захворювання у родичів, що

підтверджує теорію існування генетичної схильності до ХОЗЛ. Інтенсивність експресії β -TGF була більш вираженою у дітей з рецидивуючим бронхітом, що свідчить про високий ризик розвитку фіброзних процесів у бронхіальній стінці. При хронічному бронхіті його експресія була слабою, що інформує про завершення гістоархітектонічної перебудови. У браш-біопсійному матеріалі 3-х здорових дітей експресія TGF- β була відсутньою.

Таким чином, на погляд Заявника, використання запропонованих антагоністів набуває клінічної значущості в терапії ХОЗЛ.

Висновки. Імуноцитохімічний аналіз браш-біопсії слизової бронхів у дітей, котрі хворіють на рецидивуючі та хронічні форми бронхіту, доводить можливість ідентифікації вираженої плоскоклітинної метаплазії бронхіального епітелію за допомогою маркерів початкового ремоделінгу. За рівнем експресії Ki-67 встановлено, що вже при рецидивуючому бронхіті проліферативний потенціал бронхіального епітелію меншає, що інформує про встановлення ризику уповільнення процесів репарації та ініціації фіброзу. Виражена експресія TGF- β в епітелії слизової оболонки бронхів у дітей набуває значення маркера потенціального ризику розвитку хронічного обструктивного бронхіту, у т.ч. й склерогенезу.

Приклад.

Хворий Ф., 1991р.н. історія хвороби №273, перебував у міському дитячому пульмонологічному відділенні клінічної лікарні №2 м.Дніпропетровська з попереднім діагнозом: хронічний бронхіт.

Скарги при огляді на хронічний (більше 3 місяців на рік) кашель та періодично виникаючу задишку. Із анамнезу життя: народився доношеним, алергічні реакції не спостерігались, в дошкільному віці почав часто хворіти на ГРЗ, потім бронхіти з затяжним перебігом. Батько дитини хворіє на хронічний обструктивний бронхіт. Дитина з народження мешкає поблизу промислової зони. Тютюнопаління пасивне (палить батько). При фізикальному обстеженні: астеничний, ритм та частота дихання нормальні, перкуторно на легень яскравий легеневиий звук, аускультативно - жорстке дихання, вологі хрипи з обох сторін. За даними рентгенографії - ущільнення коренів та деформація легеневого рисунку. За даними спірометрії ОФВ-1 складає 78% від вікової норми, тест на зворотність з салбутамолом - негативний, ЖЄЛ - 87%. Було прийняте рішення, щодо прогнозування наявності або ризику ремоделінгу бронхів на тлі хронічного бронхіту за умов запропонованого способу. Проведено діагностичну бронхоскопію, під час якої після візуальної оцінки стану бронхів, за допомогою ендоскопічної щітки зроблено отиск від слизової бронхів на адгезивні стекла (були оброблені адгезивною рідиною «SuperFrost Plus»). Виявлення експресії моноклональних антитіл проводилось за вищенаведеною методикою. При цьому, завершення реакції оцінювали за коричневими відтінками титрів, розподілом міток в ядрі або на мембрані, у залежності від локалізації шуканих структур, локалізацією антигенних детермінант цитокератинів, плескати епітеліїв 34 β E12 і TGF- β на мембрані й субмембранним чином у цитоплазмі, а Ki-

67 – за інтрануклеарним розподілом (див. мал.1, 2).

Оцінка результатів імуноцитохімічної реакції здійснювалась за допомогою методів, прийнятих в імуногістохімії: якісно з визначенням ступеня експресії в балах (по інтенсивності забарвлення) та кількісно в відсотках за співвідношенням до переліжених клітин.

За даними візуального аналізу слизова оболонка бронхів мала незначний набряк та гіперемію. Імуноцитохімічне заключення по даному біоматеріалу було таким: позитивна експресія TGF- β в епітелії слизової оболонки бронхів на тлі зниження проліферативного потенціалу бронхіального епітелію (частота експресії Ki-67-2од.) та виражених ознак метаплазії (частота експресії 34 β E12 більше 16од.). Таким чином, у даного пацієнта були присутні всі три вірогідні ознаки початку ремоделювання. Враховуючи клініко-анамнестичні дані, дані спірометрії та рентгенографії діагноз хронічного бронхіту було підтверджено. Наявність сімейного анамнезу, мешкання в промисловій місцевості, пасивне паління є факторами ризику розвитку хронічного обструктивного захворювання легень. Імуноцитохімічне дослідження підтверджує наявність початку ремоделінгу бронхів, фіброзу і дає можливість прогнозувати з вірогідністю до 98% розвиток ХОЗЛ в майбутньому.

Практичним результатом визначеного прогнозу перебігу хронічного бронхіту та формування ХОЗЛ у цієї дитини було визначення індивідуальної профілактично-лікувальної програми (в т.ч. включення ліків-антиоксидантів), профорієнтація підлітка, рекомендації по екології помешкання, профілактика дії як активного так і пасивного тютюнопаління.

Таким чином, запропоноване рішення задачі відповідає умові «промислова придатність», як таке, що може бути використаним в дитячій пульмонології, з можливістю перевернення вищенаведеного технічного результату і забезпечує реалізацію «продукту» у вигляді клінічного висновку, насамперед, на основі засобів, що стали відомими за подією пріоритету та поєднаними в рішенні поставленої задачі. При цьому характеристика заявленого способу, що зазначена у н.п. Формули, визначає відмінність його від об'єктів аналогічного призначення і допускає можливість набуття правового статусу як корисної моделі процесу.

Аналоги:

1. Глобальная стратегия диагностики, лечения и профилактики хронической обструктивной болезни легких. М.: «Атмосфера», 2003. -С.39.

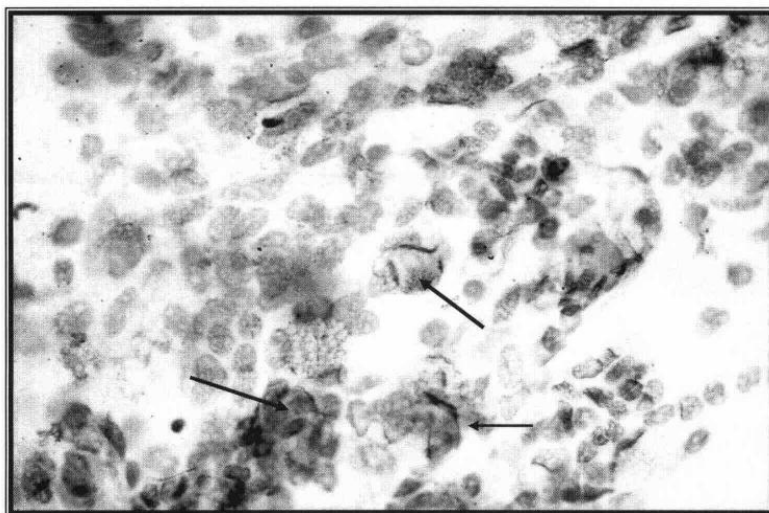
2. Способ прогнозирования бронхиальной обструкции при хроническом бронхите: Пат. 2002111601 России, МПК А61В 5/00; опубл. 20.11.03.

3. Антипкін Ю.Г., Задорожна Т.Д., Пустовалова О.І.. Роль імуноцитохімічних досліджень в ранній діагностиці запальних процесів дихальних шляхів у дітей // Актуальні питання педіатрії. -2006. -№1. -С.45-47.

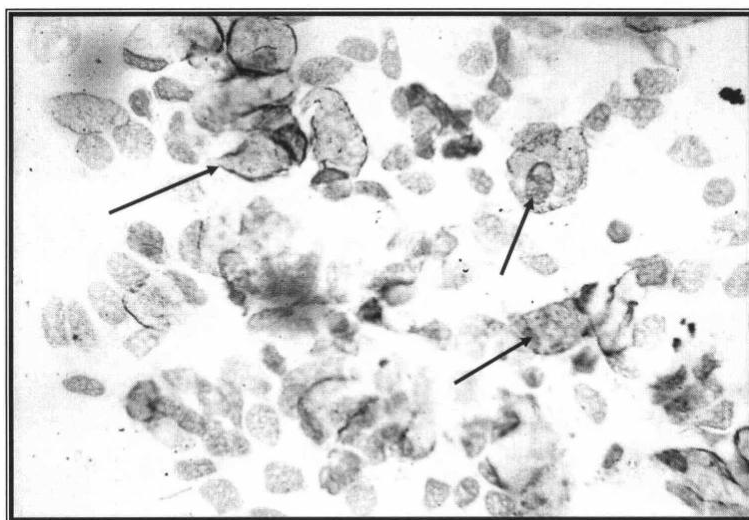
4. Способ ранней неинвазивной диагностики процессов ремоделинга бронхов при хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) у мужчин:

Пат. 2285264 С2 России, МПК G01N 33/68, G01N 33/53 / Степанищева Л.А., Теплова С.Н., Игнатова Г.Л. (Россия). - №2004138916/15; заявл. 30.12.04; опу-бл.10.10.06.

5. Пат. 2240560 России, МПК G01N33/53. Способ прогнозирования метастазирования увеальной меланомы на основе маркеров ВАХ і KI-67 / Степанова Е. В., Сутулов А.Ю. (Россия). - №2003106294/15; заявл.06.03.03; опу-бл. 20.11.04.



Мал.1



Мал.2