



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **68768**

(13) **U**

(51) МПК

**G01N 33/50** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

**G01N 33/577** (2006.01)

**A61K 35/62** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2011 11339**

(22) Дата подання заявки: **26.09.2011**

(24) Дата, з якої є чинними  
права на корисну  
модель: **10.04.2012**

(46) Публікація відомостей  
про видачу патенту: **10.04.2012, Бюл.№ 7**

(72) Винахідник(и):

**Фролов Олександр Кирилович (UA),  
Копійка Віра Вікторівна (UA),  
Федотов Євген Рудольфович (UA),  
Литвиненко Раїса Олександрівна (UA),  
Процько Юлія Сергіївна (UA)**

(73) Власник(и):

**ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ  
ЗАКЛАД "ЗАПОРІЗЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ  
УНІВЕРСИТЕТ" МІНІСТЕРСТВА ОСВІТИ І  
НАУКИ, МОЛОДІ ТА СПОРТУ УКРАЇНИ,  
вул. Жуковського, 66, м. Запоріжжя, МСП -  
41, 69600 (UA)**

## (54) СПОСІБ РЕГУЛЮВАННЯ АКТИВНОСТІ ЛІМФОЦИТІВ В ОРГАНІЗМІ ЛЮДИНИ

(57) Реферат:

Спосіб регулювання активності лімфоцитів у організмі людини включає забір крові з вени з антикоагулянтом до та після лікування, виділення з крові лімфоцитів, визначення кількості регуляторних субпопуляцій лімфоцитів, розрахунок регуляторного індексу стану імунної системи та проведення курсу гірудотерапії.

UA 68768 U



Спосіб належить до біології та медицини, а саме до імунологічних методів оцінки та регулювання стану імунної системи людини за співвідношенням хелперних та супресорних субпопуляцій лімфоцитів.

Відомий спосіб регулювання активності лімфоцитів в організмі людини (Клубова Г.Ф. Ревматоїдний артрит: стан системного та локального імунітету на фоні застосування глюкокортикостероїдів і базисної терапії / Клубова Г.Ф. // Український ревматологічний журнал. - 2003. - № 1. - с. 45-50), який включає: забір крові з вени з антикоагулянтами до та після лікування, виділення з неї лімфоцитів на градієнті щільності, визначення, із застосуванням стандартної панелі моноклональних антитіл до CD-структур, кількості популяцій лімфоцитів: CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>, CD22<sup>+</sup>, розрахунок за співвідношенням CD4<sup>+</sup> до CD8<sup>+</sup> регуляторного індексу імунної системи і за його рівнем введення препарату кортикостероїдів або аналогів за терапевтичним протоколом.

Спільними із запропонованими ознаками є:

- забір крові з вени з антикоагулянтом до та після лікування;
- виділення з крові лімфоцитів;
- визначення, із застосуванням моноклональних антитіл, кількості регуляторних субпопуляцій лімфоцитів: CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>;
- розрахунок регуляторного індексу стану імунної системи за співвідношенням хелперних і супресорних субпопуляцій;
- проведення терапевтичної процедури.

Недоліком способу є недостатня ефективність синтетичних та біотехнологічних препаратів для регулювання кількості та стану лімфоцитів в організмі людини, які відповідають гомеостатичному.

Причинами, що перешкоджають досягненню результату, є:

- пригнічення кортикостероїдами основних етапів імуногенезу: проліферації, диференціювання та міграції лімфоцитів у лімфоїдних органах людини;
- розвиток вторинного імунодефіциту через супресію імунітету;
- виникнення різноманітних ускладнень (інфекцій, алергічних реакцій, онкологічних захворювань).

Відомий спосіб регулювання активності лімфоцитів в організмі людини (Анализ биологической активности тимогена и синтетических аналогов тимопентина / [Мирошниченко И.В., Шарова Н.И., Рябинина И.Д. и др.]. - Иммунология. - 1997. - № 2. - с. 25-28), що включає: визначення активності лімфоцитів до та після лікування, яке здійснюють шляхом забору крові з вени з антикоагулянтами, виділення з неї лімфоцитів на градієнті щільності, виявлення серед них кількості субпопуляцій CD4<sup>+</sup> та CD8<sup>+</sup> із застосуванням моноклональних антитіл, розрахунку за співвідношенням CD4<sup>+</sup> до CD8<sup>+</sup> регуляторного індексу стану імунної системи, за яким по протоколу лікування призначають препарати гормонів тимусу.

Недоліком способу є недостатня ефективність коригування хелперно-супресорного співвідношення лімфоцитів імунної системи за допомогою біотехнологічних та синтетичних препаратів тимусу.

Спільними, із запропонованим рішенням, ознаками є:

- забір крові з вени з антикоагулянтом до та після лікування;
- виділення з крові лімфоцитів;
- визначення в ній кількості регуляторних CD4<sup>+</sup> до CD8<sup>+</sup> субпопуляцій лімфоцитів із застосуванням моноклональних антитіл;
- розрахунок регуляторного індексу стану імунної системи;
- проведення з його врахуванням терапевтичної процедури лікування.

Причинами, що перешкоджають досягненню результату є:

- природна властивість гормонів тимусу переважно активувати хелперну ланку імунної системи, що викликає порушення балансу регуляторних лімфоцитів в організмі хворого;
- виникнення різних ускладнень (лімфопроліферативних захворювань, онкогенезу, аутоімунних захворювань).

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб регулювання активності лімфоцитів в організмі людини, який шляхом проведення курсу гірудотерапії (ГТ), визначення кількості регуляторних CD4<sup>+</sup> до CD8<sup>+</sup> субпопуляцій лімфоцитів із застосуванням моноклональних антитіл та розрахунку регуляторного індексу стану імунної системи дозволяє природними біологічно активними речовинами (БАР) медичної п'явки гомеостатично нормалізувати співвідношення хелперних і супресорних субпопуляцій лімфоцитів в організмі людини.

Суттєвими ознаками способу є:

- забір крові з вени з антикоагулянтом до та після лікування;
- виділення з неї лімфоцитів;
- визначення в крові кількості регуляторних субпопуляцій CD4<sup>+</sup> та CD8<sup>+</sup> із застосуванням моноклональних антитіл;

5     - розрахунок регуляторного індексу стану імунної системи за співвідношенням CD4<sup>+</sup> до CD8<sup>+</sup>;

- проведення курсу гірудотерапії.

Відмінними від найближчого аналога ознаками є:

проведення курсу гірудотерапії як лікувальної процедури.

10     Спосіб здійснюють таким чином. Виконують забір крові (не менше 2 мл) з вени з антикоагулянтом (наприклад, з гепарином у кількості 0,2 мг/мл), виділяють з неї лімфоцити, визначають серед них кількість CD4<sup>+</sup>- та CD8<sup>+</sup>-субпопуляцій лімфоцитів, наприклад із застосуванням еритроцитарного діагностикуму кон'югованого моноклональними антитілами, відповідно анти-CD4<sup>+</sup> та анти-CD8<sup>+</sup>, за співвідношенням CD4<sup>+</sup> до CD8<sup>+</sup> розраховують

15     регуляторний індекс стану імунної системи, за яким призначають курс ГТ. Об'єм та ефективність ГТ визначають за гомеостатичним рівнем хелперно-супресорної рівноваги активності лімфоцитів в організмі людини. Регуляторний індекс є відображенням рівня хелперно-супресорної рівноваги активності лімфоцитів в організмі обстежуваного.

Імунологічне обґрунтування способу.

20     У основу способу покладено відомості про взаємну адаптацію медичної п'явки (МП) та водопійних копитних і ссавців. На початкових етапах еволюції МП - це облігатний гемофаг та ектопаразит водопійних копитних ссавців (антибіотичні відносини). У процесі багатомільйонної сумісної еволюції відбулася їх взаємна адаптація і перехід до мутуалістичних (взаємовигідних) відносин. Так, МП отримує від ссавця 3-5 мл крові як їжу, а вприскує у складі слини в його

25     внутрішнє середовище понад 100 біологічно активних речовин, які регулюють гомеостаз ссавця, підвищують резистентність до хвороб. Одним із механізмів резистентності до хвороб є нормалізація співвідношення хелперних та супресорних субпопуляцій лімфоцитів імунної системи завдяки протизапальній дії БАР слини МП, таких як бделіни, егліни, гірустазин та інші. Вони пригнічують активність протеолітичних ферментів, цитокінів, які виділяють

30     імунокомпетентні клітини на початкових етапах імунної відповіді. У результаті дії БАР знижують рівень хелперної субпопуляції лімфоцитів (CD4<sup>+</sup>), яка активується на початкових етапах імунної відповіді, та підвищують вміст супресорної субпопуляції клітин (CD8<sup>+</sup>), яка регулює імуногенез на його кінцевих етапах.

Покращення мікроциркуляції в патологічних органах БАР слини МП у процесі ГТ прискорює

35     в них імунологічне забезпечення репараційних процесів, сприяє відновленню порушеного структурного гомеостазу.

Приклад виконання способу.

У 20 хворих на гіпертонічну хворобу II стадії (6 чоловіків та 14 жінок), середній вік - 52,3±6,9 років брали зразки крові з вени об'ємом 10 мл до початку курсу ГТ та на першому тижні після

40     його закінчення. Кров стабілізували кристалічним гепарином (Спофа) в кінцевій концентрації 0,2 мг/мл. У зразках крові визначали кількість лейкоцитів та лімфоцитів для проведення більш інформативного імунологічного дослідження та обґрунтування запропонованого способу. У суспензії лімфоцитів, виділеної на фікол-верографіновому градієнті (1,077 г/мл), визначали кількість субпопуляцій CD4<sup>+</sup> (Т-хелпери) та CD8<sup>+</sup> (Т-кілери/супресори) за допомогою

45     еритроцитарного діагностикуму, кон'югованого відповідними моноклональними антитілами - анти-CD4<sup>+</sup> та анти-CD8<sup>+</sup> (НПО «Гранум», м. Харків), розраховували регуляторний індекс стану імунної системи за співвідношенням CD4<sup>+</sup> до CD8<sup>+</sup>, за яким призначали курс гірудотерапії.

Статистичну обробку отриманих результатів здійснювали за допомогою пакета програм «Statistica 6,0». Отримані дані наведені в таблиці.

50

Таблиця

Гомеостатичне регулювання хелперно-супресорної активності лімфоцитів крові у хворих на гіпертонічну хворобу в процесі гірудотерапії

Показники		Період обстеження	
		До ГТ	Після ГТ
Лейкоцити, Г/л		5,36±0,22	4,85±0,18*
Лімфоцити	%	38,8±2,1	31,8±1,8*
	Г/л	2,08±0,12	1,54±0,11*
CD4 <sup>+</sup> (хелпери)	%	41,0±2,1	35,8±1,8*
	Г/л	0,85±0,09	0,55±0,06*
CD8 <sup>+</sup> (кілери/супресори)	%	17,0±1,5	27,5±2,1*
	Г/л	0,35±0,04	0,43±0,05
Регуляторний індекс (CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> )	%	2,41±0,14	1,30±0,09*
	Г/л	2,43±0,15	1,28±0,07*

Примітка: n=20 - кількість обстежених;

\* - достовірні відмінності показників до та після ГТ (p<0,05).

У всіх хворих курс ГТ проводили амбулаторно, тривалістю 4-4,5 тижнів, у кількості 25-35 шт. МП на курс на зони Захар'їна-Хеда. Дана схожість курсів ГТ дозволила вважати її основним фактором, що впливав на стан імунної системи організму хворого.

Як видно з даної таблиці, у хворих на гіпертонію до ГТ спостерігалася тенденція до лейкоцитозу і лімфоцитозу переважно за рахунок хелперних субпопуляцій лімфоцитів (CD4<sup>+</sup>). Така тенденція спостерігалась як серед відносних, так і їх абсолютних показників (p<0,05). Виявлено зниження вмісту CD8<sup>+</sup>-субпопуляції лімфоцитів (Т-кілери/супресори). У результаті регуляторний індекс складав 2,41±0,14, тобто кількість субпопуляції лімфоцитів CD4<sup>+</sup> майже у 2,5 рази перевищувала вміст субпопуляції CD8<sup>+</sup>. Після курсу ГТ кількість лейкоцитів та лімфоцитів поверталася до меж середніх фізіологічних значень для даного віку. При цьому надмірна кількість Т-хелперів (CD4<sup>+</sup>) зменшувалася в абсолютних показниках на 35 % (0,85±0,09 та 0,55±0,06 Г/л, відповідно до та після ГТ) за рахунок збільшення Т-кілерів/супресорів (CD8<sup>+</sup>) на 23 % (0,35±0,04 та 0,43±0,05 Г/л, відповідно до та після ГТ). У результаті регуляторний індекс досягав його оптимального рівня і складав 1,30±0,09 та 1,28±0,07 для відносних та абсолютних значень регуляторних лімфоцитів. Отже, курс ГТ на зони Захар'їна-Хеда у хворих з гіпертонічною хворобою сприяв покращенню трофіки тканин органів в організмі, оптимізації співвідношення хелперної та супресорної активності лімфоцитів, що виникала на фоні зниження артеріальної гіпертензії.

Таким чином, запропонований спосіб регулювання активності лімфоцитів в організмі хворого шляхом визначення регуляторного індексу стану імунної системи та проведення з його урахуванням відповідного курсу ГТ забезпечує коригування співвідношення хелперних (CD4<sup>+</sup>) і супресорних (CD8<sup>+</sup>) субпопуляцій лімфоцитів в організмі людини в гомеостатичному напрямку.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб регулювання активності лімфоцитів у організмі людини, який включає забір крові з вени з антикоагулянтом до та після лікування; виділення з крові лімфоцитів; визначення в ній кількості регуляторних CD4<sup>+</sup> та CD8<sup>+</sup> субпопуляцій лімфоцитів із застосуванням моноклональних антитіл; розрахунок регуляторного індексу стану імунної системи; проведення з його урахуванням терапевтичної процедури лікування, який **відрізняється** тим, що як лікувальну процедуру проводять курс гірудотерапії.

Комп'ютерна верстка М. Мацело

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

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