



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **91620** (13) **U**
(51) МПК (2014.01)
A61B 10/00
G01N 33/48 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2014 01490	(72) Винахідник(и): Осипчук Дарія Віталіївна (UA), Донської Борис Владиславович (UA), Чернишов Віктор Павлович (UA)
(22) Дата подання заявки: 17.02.2014	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.07.2014	(73) Власник(и): ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ПЕДІАТРІЇ, АКУШЕРСТВА І ГІНЕКОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ", вул. Платона Майбороди, 8, м. Київ, 04050 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.07.2014, Бюл.№ 13	

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ ХРОНІЧНОЇ ГРАНУЛЬОМАТОЗНОЇ ХВОРОБИ

(57) Реферат:

Спосіб діагностики хронічної гранульоматозної хвороби включає дослідження венозної крові. При цьому досліджують відсотковий вміст гранулоцитів, що продукують реактивні кисневі сполуки під впливом стимуляції ліпополісахариду та зимозану, та окиснюють нефлуоресцентний дигідрородамін-123 до флуоресцентної сполуки родаміну-123, після чого за відсотковим вмістом активованих гранулоцитів в умовах експерименту під впливом стимуляції зимозану та ліпополісахарду діагностують хронічну гранульоматозну хворобу.

UA 91620 U

Корисна модель належить до галузі медицини, зокрема клінічної імунології, педіатрії, може бути використана для рутинної лабораторної діагностики пацієнтів з підозрою на хронічну гранульоматозну хворобу.

Хронічна гранульоматозна хвороба (ХГХ) - первинний імунодефіцит, в основі якого лежить дефект НАДФН-оксидази - ензиму, відповідального за кисневий вибух і продукцію кисневих радикалів у фагоцитах. За відсутності активного ферменту кисневі радикали не продукуються, що призводить до порушення мікробіцидної функції фагоцитів. Такі хворі схильні до рецидивних бактеріальних і грибкових інфекцій [1].

Лабораторна діагностика ХГХ ґрунтується на визначенні активності кисневозалежної бактерицидної функції нейтрофілів. До діагностичних тестів належать: НСТ - тест - відновлення нітросинього тетразолію реактивними кисневими сполуками та метод дослідження окисації дигідрородаміну-123 із використанням проточної цитометрії. За допомогою останнього визначається відсоток фагоцитів, які продукують реактивні кисневі сполуки (окислюють нефлуоресцентний дигідрородамін-123 (ДГР-123) до флуоресцентного компоненту - родаміну-123). На відміну від тесту з дигідрородаміном-123, НСТ-тест часто призводить до хибно-негативних результатів та є більш суб'єктивний, так як підрахунок базується на мікроскопічному дослідженні обмеженої кількості клітин [2, 3].

Як комерційні активатори в тесті з ДГР-123, використовують бактеріальний формілпептид (fMLP), суспензію опсонізованої *E.coli*, як позитивний контроль - форбол-міристам ацетат (ФМА). Використання опсонізованої *E.coli* як активатора потребує використання додаткових флуоресцентних сполук, для відокремлення бактерій від клітин крові, що підвищує собівартість методу.

Зимозан - біополімер дріжджової оболонки *Saccharomyces cerevisiae*, до складу якого входять в основному полісахариди. Основну біологічну активність зимозану визначають вуглеводи, зокрема глюкани. Показано, що зимозан активує гранулоцити - стимулює фагоцитоз, секрецію лізосомальних ферментів, утворення сполук реактивного кисню [4].

Ліпополісахарид (ЛПС) різноманітних патогенів добре відомий як потужний активатор імунних клітин, зокрема гранулоцитів. Показано, що інкубація з ЛПС призводить до активації кисневого вибуху гранулоцитів, підвищеної експресії адгезивних молекул та синтезу протимікробних сполук [5-7]. Таким чином, ЛПС та зимозан є надійними та потужними активаторами захисних функцій фагоцитів, зокрема ініціації кисневого вибуху, що дозволяє використовувати їх в тесті ДГР-123 для діагностики ХГХ.

Відомий спосіб визначення резерву реактивності нейтрофілів (оксидантного потенціалу) [Пат. 2457488 C2 RU 05.05.2010], в якому резерв реактивності (оксидантний потенціал) нейтрофілів вимірюється наступним чином: проводять виміри світлосуми спонтанної хемілюмінесценції цільної розведеної крові в розчині люміналу, відразу після забору і через 4 години після її інкубації, потім проводять розрахунок різниці світлосуми (PPC) як різницю вимірів після 4 годин і виміру, проведеного відразу після забору крові, при цьому за норму значень PPC приймають 1-99 % відсотковий інтервал загального діапазону значень контрольної групи здоровий донорів; значення PPC нижче 1 % відсоткового інтервалу свідчить про зниження резерву реактивності нейтрофілів, значення, що перевищують 99 % інтервалу - свідчать про процес оксидантного стресу, альтерації клітин та розвитку деструктивного процесу.

Недоліком способу є занадто широкий інтервал норми показників, що може давати хибно-негативні результати в дослідженні функціональної активності нейтрофілів, так як частково знижені показники, теж може бути свідченням дефектів системи гранулоцитів. Також, в методі, зміни активації відбуваються під впливом ендогенних субстанцій, що унеможлиблює процес стандартизації та контролю процедури.

Близьким, до об'єкта, що заявляється, є спосіб діагностики функціонального стану нейтрофілів людини [Пат. 2218567 C2 RU], в якому функціональний стан нейтрофілів людини визначається шляхом дослідження кисневозалежного метаболізму. Для цього попередньо виділяють нейтрофільні гранулоцити, ставлять реакцію відновлення нітросинього тетразолію в 96 лункових планшетах для імунологічних досліджень із наступною фіксацією результатів реакції за допомогою багатоканального фотометра. Функціональний стан оцінюють за рівнями спонтанної та індукованої активності, що вимірюється в одиницях оптичної густини. Як стимулятори використовують опсонізований та неопсонізований зимозан. Для кожного зразка визначають коефіцієнт активації як відношення індукованого рівня клітинної активації до спонтанного рівня активності, а за відношенням індукованого опсонізованим зимозаном рівня активності до індукованого неопсонізованим зимозаном рівня визначають коефіцієнт опсонізації.

Основним недоліком вищенаведеного способу є тривалість та складність виконання способу. Попереднє виділення нейтрофілів може провокувати високі рівні спонтанної активності; також не аналізується стан інших популяцій гранулоцитів та моноцитів, що є важливим для діагностики ХГХ.

В основу корисної моделі, що заявляється, поставлено задачу створення способу діагностики хронічної гранульоматозної хвороби, в якому визначається відсоток гранулоцитів, що продукують реактивні кисневі сполуки, після інкубації з активаторами - зимозаном та ліпополісахаридом, значне зниження відсотку активованих гранулоцитів свідчить про дефекти механізму кисневого вибуху, при цьому для виконання способу значно дешевший, так як не потребує використання опсонізованої *E.coli* та додаткових флуоресцентних сполук для розділення бактерій та клітин, та може використовуватись для більш точної діагностики.

Поставлена задача вирішується шляхом дослідження венозної крові, при цьому, згідно з корисною моделлю, досліджується відсотковий вміст гранулоцитів, що продукують реактивні кисневі сполуки під впливом стимуляції ЛПС та зимозану, та окислюють нефлуоресцентний дигідрородамін-123 до флуоресцентної сполуки родаміну-123, причому відсотковий вміст активованих гранулоцитів в умовах експерименту під впливом стимуляції зимозану та ЛПС в діапазоні >75 % вважається нормальним, відсутність або значне зниження рівня активованих гранулоцитів(<10-18 %) є діагностичною ознакою хронічної гранульоматозної хвороби.

Спосіб діагностики хронічної гранульоматозної хвороби здійснюється наступним чином: по 100 мкл гепаринізованої крові кожного зразка вносять до 4 пробірок (A, B, C, D) та охолоджують до 0 °C на льодяній бані. Потім до пробірок A додають по 20 мкл RPMI-1640 (спонтанний контроль), до B - 20 мкл суспензії зимозану, до C - 20 мкл суспензії ЛПС, до D-20 мкл ФМА. Для порівняння в додатковій пробірці проводили інкубацію із суспензією опсонізованої *E.coli*. Перемішують та переносять на водяну баню(37 °C) на 10 хв., потім до кожної пробірки додають 20 мкл ДГР-123, перемішують та залишають ще на 10 хв. Після цього всі пробірки одночасно знімають з водяної бані та додають по 1 мл лізуючого розчину Lysing Solution (Becton Dickinson), перемішують та залишають на 20 хв. при кімнатній температурі. Потім зразки відкручують на центрифугу(5 хв., 250 g, 2-5 °C). Зливають залишок, відмивають за допомогою Cell Wash (Becton Dickinson) та знову відкручують. Після цього зливають надосад, перемішують та аналізують на приладі FACSCan (Becton Dickinson). До зразків, що інкубувались з *E.coli*, додатково додають 200 мкл DNA staining solution (Glycotape Biotechnology) та залишають на 20 хв., в захищеному від світла місці. В аналіз бралися не менше 10000 подій.

Аналізувався відсотковий вміст фагоцитів, що конвертували ДГР-123 до флуоресцентної сполуки - родамін-123. Відсотковий вміст активованих фагоцитів в здорових донорів перевищував 75 %, тоді як у пацієнтів з ХГХ, відсотковий вміст був в межах 10-18 %. Результати досліджень піддавали варіаційно-статистичній обробці за Стьюдентом з використанням програмного пакета Microsoft Excel.

Клінічні приклади

Приклад 1, Пацієнт Г., 2 роки 11 місяців. Раніше підтверджений діагноз ХГХ. Результати дослідження від 05.11.2013 р.: рівень активованих гранулоцитів внаслідок інкубації із зимозаном - 10,3 %, із ЛПС - 11,2 %, з ФМА- 13,7 %, із *E. coli* - 18 %.

Приклад 2. Здоровий донор О., 24 роки. Результати дослідження від 24.10.2013 р.: рівень активованих гранулоцитів внаслідок інкубації із зимозаном - 96 %, із ЛПС - 75 %, з ФМА - 96 %, із *E. coli* - 99 %.

Таким чином, вищевикладені дані свідчать, що впровадження даного способу в лабораторну практику дозволяє достовірно діагностувати хронічну гранульоматозну хворобу, та робить діагностику менш дорогою за рахунок доступності активаторів, що використовуються.

Джерела інформації:

1. Л.І. Чернишова, А.П. Волоха Дитяча імунологія. К:Медицина; 2013.

2. P. Soler-Palacina, C. Margaretoa, P. Llobeta et al. Chronic granulomatous disease in pediatric patients:25 years of experience // Allergol et Immunopathol. - 2007. - 35-P. 83-89.

3. G. Dimitrova, C. Bunkall, D. Lim and Christopher Kendrick. Comparison of two methods for the diagnosis of chronic granulomatous disease-neutrophil oxidative burst measured by the nitroblue tetrazolium slide test versus the dihydrorhodamine 123 flow cytometric assay // N Z J Med Lab Sci. - 2013. - 67-P. 45-51.

4. Makni-Maalej K, Chiandotto M, Hurtado-Nedelec M et al. Zymosan induces NADPH oxidase activation in human neutrophils by inducing the phosphorylation of p47phox and the activation of Rac2: involvement of protein tyrosine kinases, PBKinase, PKC, ERK1/2 and p38MAPkinase // Biochem Pharmacol. - 2013. - 85-P. 92-100.

5. Aida, Y., K. Kusomoto, K. Nakatomi et al. An analogue of lipid A and LPS from Rhodobacter sphaeroides inhibits neutrophil responses to LPS by blocking receptor recognition of LPS and by depleting LPS-binding protein in plasma // J. Leukocyte Biol. - 1995. - 58-P. 675-682.

6. R.H. Bohmer, L.S. Trinkle, and J.L. Staneck. Dose Effects of LPS on Neutrophils in a Whole Blood Flow Cytometric Assay of Phagocytosis and Oxidative Burst // Cytometry. - 1992. - 13-P. 525-531.

7. Lisa C. Parker, Moira K.B. Whyte, Steven K. Dower et. al. The expression and roles of Toll-like receptors in the biology of the human neutrophil // J. Leukoc. Biol. - 2005. - 77-P. 886-892.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб діагностики хронічної гранульоматозної хвороби, що включає дослідження венозної крові, який **відрізняється** тим, що досліджують відсотковий вміст гранулоцитів, що продукують реактивні кисневі сполуки під впливом стимуляції ліпополісахариду та зимозану, та окиснюють нефлуоресцентний дигідрородамін-123 до флуоресцентної сполуки родамину-123, причому відсотковий вміст активованих гранулоцитів в умовах експерименту під впливом стимуляції зимозану та ліпополісахарду в діапазоні >75 % вважається нормальним, відсутність або значне зниження рівня активованих гранулоцитів (<10-18 %) є діагностичною ознакою хронічної гранульоматозної хвороби.

Комп'ютерна верстка О. Рябко

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