



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **77379**

(13) **U**

(51) МПК

G01N 33/48 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2012 09659**

(22) Дата подання заявки: **10.08.2012**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **11.02.2013**

(46) Публікація відомостей **11.02.2013, Бюл.№ 3**
про видачу патенту:

(72) Винахідник(и):

**Бичкова Ніна Григорівна (UA),
Бичкова Світлана Анатоліївна (UA),
Прохорова Марія Петрівна (UA),
Сліпачук Олена Валентинівна (UA)**

(73) Власник(и):

**НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ ІМ. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ,
бул. Шевченка, 13, м. Київ-4, 01601 (UA)**

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ ЕФЕКТИВНОСТІ ЛІКУВАННЯ ХВОРИХ НА БРОНХІАЛЬНУ АСТМУ ПРИ ПЕРСИСТЕНЦІЇ CHLAMYDIA PNEUMONIA

(57) Реферат:

Спосіб оцінки ефективності лікування хворих на бронхіальну астму при персистенції Chlamydia pneumoniae включає дослідження крові. До та після лікування досліджують сироватку крові, визначають сироватковий вміст прозапальних цитокінів - фактора некрозу пухлин- α (ФНП- α), інтерлейкіну-1 β (ІЛ-1 β) та інтерлейкіну-6 (ІЛ-6), і при зниженні їх концентрації після лікування до значень, які достовірно не відрізняються від норми, оцінюють лікування як ефективне.

UA 77379 U

Корисна модель належить до галузі медицини, зокрема до внутрішніх хвороб, клінічної імунології та пульмонології і призначена для оцінки ефективності лікування хворих на бронхіальну астму при персистенції *Chlamydia pneumoniae*.

Проблема бронхіальної астми (БА) є однією із актуальних в сучасній клінічній медицині в зв'язку з її ростом і розповсюдженістю, тяжким перебігом у дитячому віці, труднощами в діагностиці, складністю вибору адекватної індивідуальної терапії та підвищенням летальності [1, 2, 3].

За даними ВООЗ розповсюдженість бронхіальної астми у світі коливається в середньому від 4 до 8 %, серед дитячого населення складає від 2 до 15 %. Згідно даних епідеміологічного дослідження, проведеного у Києві в рамках міжнародного прогнозування ISAAC 1999-2000 рр., поширеність бронхіальної астми склала 6,1-8,1 % [4, 5]. Перші прояви захворювання за результатами даного дослідження відмічалися у 54,1 % хворих у ранньому віці, а у 14,3 % з них - на першому році життя. Рання ж діагностика захворювання відмічена лише у 9,5 % випадків, що свідчить про факт пізньої діагностики хвороби.

В Україні цей відсоток в дитячій популяції складає 5-10 % [6]. За даними МОЗ України інвалідизація хворих внаслідок хвороб органів дихання становить 5,3 % від загального рівня і зумовлена, головним чином, бронхіальною астмою.

Порівняно з 1992 роком інвалідизація хворих бронхіальною астмою збільшилася в 3 рази. Однією із важливих причин зростання захворюваності на бронхіальну астму та її недостатньо ефективного лікування є порушення імунного гомеостазу хворих на бронхіальну астму, формування у них імунної недостатності, коли страждають різні ланки імунної системи - клітинна, гуморальна, фагоцитарна, а за наявності бронхообструктивного синдрому, що супроводжує бронхіальну астму - і формування аутоімунного процесу. У підтримці останнього значну роль відіграє мікрофлора, особливо мікробно-вірусні асоціації, персистенція на слизових оболонках хворих на БА, атипових збудників *Chlamydia pneumoniae* та *Mycoplasma pneumoniae*, вплив негативних екологічних чинників, які сприяють зростанню екологічного навантаження на організм [7].

На даний час вже доведена значуща роль *Chlamydia pneumoniae* у виникненні уражень дихальної системи. Вона розглядається як збудник 5-20 % гострих та хронічних респіраторних захворювань, сприяє виникненню загострень БА та хронічного обструктивного захворювання легень (ХОЗЛ) [8-9].

Особливості патогенезу цієї інфекції - складний життєвий цикл хламідій, внутрішньоклітинне розташування збудника, тривала персистенція в організмі спричиняє певні труднощі в діагностиці та розробці лікувально-діагностичних заходів [10, 11]. Особливістю хламідійної інфекції є також і те, що *Chlamydia pneumoniae* як внутрішньоклітинний збудник викликає порушення в імунній системі, при цьому і сам перебіг захворювання відбувається на фоні зниження імунологічної реактивності організму [7, 12].

На даний час значна кількість досліджень присвячена вивченню ролі імунокомпетентних клітин при бронхіальній астмі, продукції активованими опасистими клітинами прозапальних цитокінів, які, в свою чергу, стають індукторами наступної продукції Т-хелперами 2 типу ІЛ-4 та ІЛ-5; ІЛ-4 ж є основним цитокіном, що переключає В-лімфоцити на синтез ІgE і лише незначна кількість робіт частково висвітлює стан імунної системи у хворих на бронхіальної астми при наявності атипових збудників.

В останні роки встановлено, що хламідії мають здатність утворювати колонії в ендотелії, пошкоджуючи судинну стінку, і, таким чином, провокують імунну відповідь з утворенням прозапальних цитокінів, що призводить до дестабілізації та наростання тяжкості перебігу захворювання.

Зміни функціонального стану імунокомпетентних клітин та дисбаланс імунних факторів захисту та агресії, в тому числі про- та протизапальних цитокінів, сприяють підвищенню рівня ЦІК в крові хворих на бронхіальну астму, а при зниженні фагоцитарної активності нейтрофілів - і порушенню їх елімінації із організму. Останні, залежно від молекулярного розміру та стану фагоцитарної системи пацієнта, можуть або знаходитись в циркуляції, або фіксуватись у тканинах ендотелію судин, а при приєднанні до антитіл, - складових ЦІК, - компонента, викликати його активацію і, таким чином, сприяти запуску пошкоджуючого патологічного процесу, активність якого тісно пов'язана із накопиченням вмісту ЦІК в кровотоці та блокуванням ними CD2- та CD3-рецепторів на Т-лімфоцитах.

Існуючі на даний час способи оцінки ефективності лікування хворих на бронхіальну астму не можуть повною мірою оцінити її за наявності персистенції *Chlamydia pneumoniae*.

Найближчим аналогом (прототипом) корисної моделі, що заявляється, є спосіб оцінки ефективності імунотерапії у хворих на бронхообструктивний синдром (БОС), що супроводжує бронхіальну астму (13).

Даний спосіб базується на визначенні в крові хворих на бронхообструктивний синдром, що супроводжує бронхіальну астму, вмісту CD 3+, CD 4+, CD 8+, CD 16+, CD 22+ - лімфоцитів, концентрації сироваткових Ig G, Ig A, Ig M та ЦІК і при нормалізації їх рівня після лікування та покращенні клінічного стану хворих судять про ефективність проведеного лікування.

Проте даний спосіб дозволяє лише детально оцінити стан імунної системи та визначити тип імунodefіциту у хворих на бронхіальнообструктивний синдром, що супроводжує бронхіальну астму, і призначити імунотерапію на основі визначення індивідуальної чутливості лімфоцитів до імуномодуляторів, але не дозволяє оцінити ефективність призначеного лікування хворим на бронхіальну астму при персистенції Chlamydia pneumoniae, яка значною мірою впливає на цитокіновий статус пацієнта.

В зв'язку з вищенаведеним видно, що вирішення проблеми адекватної оцінки ефективності лікування хворих на бронхіальну астму, поєднану з респіраторним хламідіозом, є надзвичайно актуальним.

Задачею корисної моделі є створення способу оцінки ефективності лікування хворих на бронхіальну астму при персистенції Chlamydia pneumoniae, який би був точним, інформативним та дозволив отримати найбільш достовірні дані, які б сприяли адекватній оцінці результатів проведеного лікування.

Технічний результат, що досягається від вирішення задачі, на відміну від прототипу, наведеного вище, полягає у підвищенні точності оцінки ефективності лікування за рахунок дослідження в сироватці крові концентрації прозапальних цитокінів - ФНП- α , ІЛ-1 β та ІЛ-6 - та можливості призначення в подальшому адекватної терапії хворим на бронхіальну астму при персистенції Chlamydia pneumoniae.

Відмінною особливістю способу, що заявляється, є використання як маркера ефективності лікування бронхіальної астми при персистенції Chlamydia pneumoniae концентрації прозапальних цитокінів - ФНП- α , ІЛ-1 β та ІЛ-6, які мають патогенетичне значення в перебігу бронхіальної астми, і зниження рівня яких співпадає з покращенням клінічного стану пацієнтів.

За доступними літературними даними такий спосіб оцінки ефективності лікування хворих на БА при персистенції Chlamydia pneumoniae не відомий.

Поставлена задача вирішується тим, що відомому способі оцінки ефективності лікування, який включає дослідження крові, згідно з корисною моделлю, до та після лікування досліджують сироватку крові, визначають сироватковий вміст прозапальних цитокінів - фактора некрозу пухлин- α (ФНП- α), інтерлейкіну-1 β (ІЛ-1 β) та інтерлейкіну-6 (ІЛ-6), і при зниженні їх концентрації після лікування до значень, які не відрізняються від норми, оцінюють лікування як ефективне.

Спосіб, що заявляється, здійснюється наступним чином.

Для проведення дослідження у хворого беруть кров (венозну) до та після лікування в кількості 5 мл. Кров центрифугують при 1500 об/хв. протягом 10 хвилин і після цього - знімають сироватку крові. В досліджуваній сироватці крові до та після лікування визначають вміст ФНП- α , ІЛ-1 β та ІЛ-6 за допомогою сертифікованих в Україні наборів реагентів для імуноферментного аналізу Pro Con TOB "Протеиновый контур" (Росія).

Стандартний протокол аналізу.

1. В лунки планшета А1-Д1 вносять по 100 мкл стандартів ФНП- α , ІЛ-1 β та ІЛ-6 із відомою концентрацією, в лунку Е1 вносять 100 мкл буфера (нульовий стандарт, в решту лунок вносять по 100 мкл сироватки для тестування).

2. Інкують 1 годину при t+37 °С при безперервному струшуванні.

3. Видаляють рідину із лунок, промивають лунки тричі біфосфатним буфером та двічі дистильованою водою.

4. В кожен лунку вносять по 100 мкл розчину вторинних антитіл.

5. Інкують 1 годину при t+37 °С при безперервному струшуванні.

6. Видаляють рідину із лунок, промивають лунки тричі біфосфатним буфером та двічі дистильованою водою.

7. В кожен лунку планшета вносять по 100 мкл розчину кон'югату стрептавідину з пероксидазою хрину. Інкують 30 хвилин при t+37 °С при безперервному струшуванні.

8. Видаляють рідину із лунок, промивають лунки тричі біфосфатним буфером та двічі дистильованою водою. Осушують планшет.

9. В усі лунки вносять розчин субстрату із фарбником. Інкують 20 хвилин при кімнатній температурі в місці, захищеному від прямих сонячних променів.

10. Зупиняють реакцію внесенням в кожен лунку по 50 мкл розчину сірчаної кислоти.

11. Виконують облік реакції за допомогою автоматичного фотометру при довжині хвилі 450 нм.

Наявність хламідійної інфекції оцінювали за детекцією ДНК *Chlamydia pneumonia*, яку проводили в біологічному матеріалі ампліфікаційним методом в полімеразній ланцюговій реакції та визначенням рівня специфічних антихламідіофільних Ig G- та Ig M- антитіл до *Chlamydia pneumonia* методом ІФА.

Конкретні приклади виконання.

Приклад 1

Хвора Л., 24 роки. Перебувала на стаціонарному лікуванні. Діагноз - бронхіальна астма, середньотяжкий перебіг, період ремісії. Хворіє на бронхіальну астму із 13 років. Титр Ig G-антитіл до *Chlamydia pneumonia* 1:40.

В імунограмі рівень ФНП-α в сироватці крові до лікування - 149 пг/мл, після лікування - 52 пг/мл, рівень ІЛ-1β до лікування - 134 пг/мл, після - 45 пг/мл, сироваткова концентрація ІЛ-6 до лікування - 112 пг/мл, після лікування - 14 пг/мл.

Приклад 2

Хворий С., 19 років. Перебував на стаціонарному лікуванні. Діагноз - бронхіальна астма, легкий перебіг, період ремісії. Хворіє на бронхіальну астму із 16 років. Титр Ig G-антитіл до *Chlamydia pneumonia* 1:10.

В імунограмі рівень ФНП-α в сироватці крові до лікування - 126 пг/мл, після лікування - 43 пг/мл, рівень ІЛ-1β до лікування - 119 пг/мл, після - 39 пг/мл, сироваткова концентрація ІЛ-6 до лікування - 96 пг/мл, після лікування - 12 пг/мл.

Проведені дослідження після етапу лікування показали достовірне зниження рівня прозапальних цитокінів в групі хворих на БА при персистенції *Chlamydia pneumonia*.

Статистична обробка отриманих результатів виконана на персональному комп'ютері з використанням пакету прикладних програм Microsoft XP "Excel".

По запропонованому способу було обстежено 137 хворих на бронхіальну астму, які мали супутню хламідійну інфекцію. Контрольну групу склали 30 здорових осіб, співставлюваних за віком та статтю. Отримані результати виявили високу інформативність запропонованого способу в порівнянні зі способом-прототипом (табл.). Імунологічне обстеження проводилося двічі: до лікування та через місяць після проведеної терапії.

Зміни рівня прозапальних цитокінів в динаміці лікування наведено в табл.

Таблиця

Вміст інтерлейкінів у сироватці крові хворих на бронхіальну астму при персистенції *Chlamydia pneumonia* в динаміці комплексної терапії ($M \pm m$)

Показник	До лікування (n=137)	Після лікування (n=137)	Контрольна група (n=30)
ФНП-α, пг/мл	113,96±6,71*	49,21±2,74**	42,31±2,12
ІЛ-1β, пг/мл	105,84±5,28*	43,18±2,31**	39,42±1,97
ІЛ-6, пг/мл	87,31±4,39*	12,45±0,96**	10,31±0,52

Примітки: * - достовірність різниці показників порівняно з контрольною групою ($p < 0,01$);

** - достовірність різниці показників до та після лікування ($p < 0,01$);

n - кількість обстежених хворих.

Перевагою запропонованого способу є те, що він дозволяє чітко оцінити зменшення запального процесу, підтверджує покращення клінічного стану пацієнтів, є точним, високоінформативним завдяки використанню сертифікованих в Україні та доступних за ціною наборів реагентів виробництва ТОВ "Протеїновий контур" (РФ-СПб), дозволяє оцінити клініко-імунологічну ефективність лікування пацієнтів.

Джерела інформації:

1. Ласиця О.І. Бронхіальна астма у дітей: проблеми і перспективи діагностики та лікування / О.І. Ласиця, О.М. Охотникова // Нова медицина.-2003. - № 1. - С. 44-49.

2. Сукачова А.И. Клинические симптомы и некоторые патогенетические механизмы прогрессирования бронхиальной астмы у детей / А.И. Сукачова, Н.П. Алексеева // Врачеб. практика.-2000. - №1. - С. 53-59.

3. Филипушенко И.А. "Болезнь цивилизации" - астма - и её основные факторы риска / И.А. Филипушенко //Аллергология и иммунология.-2005. - Т 6, № 3. - С. 49-54.

4. Ласица О.И. Распространённость аллергических заболеваний в городе Киеве по унифицированной методике ISAAC / О.И. Ласица, А.З. Акопян // Украинский медицинский часопис - 1999. - № 3. - С. 21-24.
5. Иванова О.Н. Распространённость бронхиальной астмы и аллергии (по данным опросника "ISAAC-PHASE II") / О.Н. Иванова // Аллергология и иммунология.-2005. - Т 6, № 3. - С. 339.
6. Акопян А.З. Распространённость аллергических заболеваний у детей / А.З. Акопян // Укр. Пульмонолог. Журнал.-2000. - № 1. - С. 65-69.
10. Прохорова М.П. Диагностика и лечение бронхиальной астмы у детей, ассоциированной с Chlamydia pneumoniae / М.П. Прохорова, Н.Г. Бычкова, Я.В. Соколова //Астма.-2001. - Т.2, № 1. - С. 120-121.
8. Иванова И.А. Хламидиоз у детей с преимущественным проявлением в виде респираторного заболевания / И.А. Иванова, С.И. Казакова // Российский медицинский журнал.- 1998. - № 2. - С. 30-32.
15. 9. Кухтинова Н.В. Анамнестические особенности течения бронхиальной астмы на фоне хламидофиллезной инфекции / Н.В. Кухтинова, С.М. Гавалов, С.А. Кротов // Астма.-2001. - Т. 2, № 1. - С. 202-203.
10. Малкова Е.М. Хламидийная инфекция у новорожденных детей / Е.М. Малкова, С.М. Гавалов, О.Н. Гришаева - Кольцове, 2002.-102 с.
20. 11. Кротов С.А. Распространенность хламидийной инфекции у детей с заболеваниями респираторного тракта / С.А. Кротов, В.А. Кротова, Н.В. Кухтинова, С.М. Гавалов // Новости "Вектор-Бест".-1999. - № 12. - С. 1-2.
25. 12. Респіраторний хламідіоз у дітей. Клініка, діагностика та лікування: Метод, рекомендації / Донецький держ. мед. університет ім. М. Горького (Е.І. Юліш, С.О. Крамаєв, І.Г. Самойленко). - Донецьк 2002.-20с.
13. Прохорова М.П. Комплексне патогенетичне лікування дітей з бронхообструктивним синдромом: автореф. дис. на здобуття наук, ступеня докт. мед. наук: спец. 14.01.10 "Педіатрія" / М.П. Прохорова. - Київ, 2005.-41с.

30

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб оцінки ефективності лікування хворих на бронхіальну астму при персистенції Chlamydia pneumoniae, що включає дослідження крові, який **відрізняється** тим, що до та після лікування досліджують сироватку крові, визначають сироватковий вміст прозапальних цитокінів - фактора некрозу пухлин- α (ФНП- α), інтерлейкіну-1 β (ІЛІ-1 β) та інтерлейкіну-6 (ІЛ-6), і при зниженні їх концентрації після лікування до значень, які достовірно не відрізняються від норми, оцінюють лікування як ефективне.

35

Комп'ютерна верстка Л.Литвиненко

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