



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **86504** (13) **U**
(51) МПК (2013.01)
A61B 10/00
G01N 33/53 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки:	a 2012 12721	(72) Винахідник(и):	Ходан Василь Васильович (UA)
(22) Дата подання заявки:	08.11.2012	(73) Власник(и):	Ходан Василь Васильович,
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель:	10.01.2014		вул. Мазепа, 177, корп. 2, кв. 78, м. Івано-Франківськ, 76018 (UA)
(41) Публікація відомостей про заявку:	25.07.2013, Бюл.№ 14		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	10.01.2014, Бюл.№ 1		

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ІНДЕКСУ АПОПТОЗНО-РЕГЕНЕРАТОРНОЇ РЕАКТИВНОСТІ ГЕПАТОЦИТІВ У ДІТЕЙ

(57) Реферат:

Спосіб прогнозування змін печінкової тканини у дітей включає визначення рівнів цитокінів $TNF\alpha$ та HGF та розрахунок індексу апоптозно-регенераторної реактивності гепатоцитів (IAPPG) за формулою:

$$IAPPG = \frac{|TNF\alpha - HGF|}{HGF}, \text{ де}$$

IAPPG - індекс апоптозно-регенеративної здатності гепатоцита;

$TNF\alpha$ - рівень фактора некрозу пухлин-альфа, пкмоль/л, в ЕДТА-плазмі людини;

HGF - рівень фактора росту гепатоцита, пкмоль/л, в ЕДТА-плазмі людини,

і при значеннях IAPPG від 0,85 до 0,97 визначають, що напруженість апоптозу і регенерації гепатоцита знаходиться в межах норми і прогноз щодо функціонування та життєздатності печінкової тканини є сприятливим,

при значеннях IAPPG від 0,39 до 0,56 визначають, що відбуваються, переважно, процеси регенерації гепатоцитів і прогноз щодо функціонування та життєздатності печінкової тканини є умовно сприятливим,

при значеннях IAPPG від 0,971 до 2,43 визначають, що відбуваються процеси апоптозу та переродження клітинної маси в сполучну тканину при гепатиті і прогноз щодо функціонування та життєздатності печінкової тканини не є сприятливим.

UA 86504 U

Корисна модель належить до медицини, зокрема до гастроентерології - розділу гепатології, і призначення для ранньої діагностики регенерації або руйнування клітин печінки у дітей та дорослих, а саме із використанням визначення індексу апоптозно-регенераторної реактивності гепатоцитів.

Відомий спосіб спрямований на визначення індексу гістологічної активності хронічного гепатита С, який включає проведення гістологічного дослідження біоптату печінки, оцінку вираженості дистрофічних і некротичних змін в печінці з подальшим визначенням активності хронічного гепатиту С за шкалою Metavir з градаціями A0, A1, A2, A3 та вимірювання площі і яскравості ядер гепатоцитів [Патент України, № 535611), від 11.10.2010, Бюл. № 19, 2010 р.], проте недоліком цього методу є те, що він енергомісткий, складний в обчисленні, вимагає спеціально підготовленого персоналу, навиків морфометричного дослідження, спеціального обладнання й не дає уявлення про регенераторну можливість гепатоцитів.

Найбільш близьким і вибраним як прототип, є спосіб визначення індексу життєздатності клітин, який полягає у розрахунку різниці загибелі культури кишкової палички M-17 в дослідній і контрольній групах, а отриманий результат визначає ступінь тяжкості перебігу захворювання [Патент України, № 58501U, від 11.04.2011, Бюл. № 7, 2011 р.], проте недоліком цього способу є те, що він не відображає апоптичну й регенераторну здатність клітин, констатує наявність ступеня тяжкості захворювання і не показує подальший ймовірний прогноз клітинної життєздатності.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити новий ефективний метод ранньої діагностики апоптозу, склерозу, цирозу або регенераторної реактивності печінкових клітин при хронічному ураженні жовчного міхура та жовчовивідних шляхів, гострих і хронічних ураженнях печінки запального і дистрофічного ґенезу у дітей, шляхом визначення апоптичних та антиапоптичних цитокінів. В результаті обстеження забезпечується швидка відповідь про ознаки цитолізу чи регенераторного клітинного синтезу, яка дозволяє прийняти вірну тактику подальшого діагностування та лікування дитини.

Поставлена задача вирішується тим, що розрахунок індексу апоптозно-регенераторної реактивності гепатоцитів (I_{APPG}), спосіб прогнозування змін печінкової тканини у дітей включає визначення рівнів цитокінів $TNF\alpha$ та HGF та розрахунок індексу апоптозно-регенераторної реактивності гепатоцитів (I_{APPG}) за формулою:

$$I_{APPG} = \frac{|TNF\alpha - HGF|}{HGF}, \text{ де}$$

I_{APPG} - індекс апоптозно-регенеративної здатності гепатоцита;

$TNF\alpha$ - рівень фактора некрозу пухлин-альфа, пкмоль/л, в ЕДТА-плазмі людини;

HGF - рівень фактора росту гепатоцита, пкмоль/л, в ЕДТА-плазмі людини,

і при значеннях I_{APPG} від 0,85 до 0,97 визначають, що напруженість апоптозу і регенерації гепатоцита знаходиться в межах норми і прогноз щодо функціонування та життєздатності печінкової тканини є сприятливим,

при значеннях I_{APPG} від 0,39 до 0,56 визначають, що відбуваються, переважно, процеси регенерації гепатоцитів і прогноз щодо функціонування та життєздатності печінкової тканини є умовно сприятливим,

при значеннях I_{APPG} від 0,971 до 2,43 визначають, що відбуваються процеси апоптозу та переродження клітинної маси в сполучну тканину при гепатиті і прогноз щодо функціонування та життєздатності печінкової тканини не є сприятливим.

За рахунок визначення факторів, першого, який відповідає за ріст, регенерацію печінкових клітин та другого, який відповідає за загибель та руйнування клітин і відповідний розрахунок їх співвідношення, відзначається прогноз в залежності від характеру пошкодження печінки, що дає достатнє рішення для поставленої задачі.

Так, як дослідження проводиться із забором незначної кількості венозної крові, це дає можливість уникнути більшої інвазивності, які пов'язані виконанням із забором біологічної тканини печінки, попередження розвитку ймовірної кровотечі при виконанні прижиттєвої пункційної біопсії у дитини. Таким чином виконується одна із вимог для проведення менш інвазивнішого дослідження.

Поряд з цим спосіб дослідження достатньо інформативний. Може проводитися в клінічних умовах, дозволяє проводити діагностику стану гепатоцитів та контроль за ефективністю лікування.

Отже, вивчення індексу I_{APPG} дозволяє виявити ураження печінки та надати чітку інформацію щодо подальшого прогнозу перебігу регенеративного чи руйнівного характеру гепатоцитів.

Спосіб визначення індексу апоптозно-регенеративної реактивності гепатоцитів у дітей здійснюється таким чином.

Спочатку проводять забір венозної крові натщесерце у дитини зранку у спеціальний шприц-контейнер із консервантом ВДТА. Кров центрифугують, осаджують формені елементи і забирають плазму крові в стерильну пробірку. Визначення фактора росту гепатоцита та фактора некрозу пухлин-альфа проводилася за допомогою реагентних наборів фірми-виробника ELISA Kit, Фінляндія номер по каталогу TNFa021, Human і KAC2211.

Цей тест заснований на методі твердофазного імуоферментного аналізу. Мікропланшет покривається специфічними моноклональними антитілами до hHGF та $TNF\alpha$. В ході реакції в лунки планшета додаються стандарти, контролю і невідомі зразки. Під час першої інкубації зв'язується довільно з іммобілізованими в лунках антитілами одним сайтом зв'язування. Після промивання додаються другі біотиніліровані антитіла. Під час другої інкубації іммобілізований в першій інкубації фактори зв'язується з біотинілірованими антитілами, що знаходяться в розчині, другим сайтом. Після видалення надлишку антитіл додається стрептавідин-пероксидаза, яка зв'язується з біотинілірованими антитілами з формуванням комплексу з 4-х компонентів. Після другої інкубації і промивання віддаляється фермент, що не зв'язався, після чого додається субстратний розчин, який взаємодіє з ферментом з утворенням кольорового комплексу. Інтенсивність забарвлення розчину прямо пропорційна концентрації вмісту факторів, присутнього в зразку.

Отримані результати рівнів факторів росту гепатоцита і фактора некрозу пухлин-альфа було піддано статистичному аналізу із розрахунком показників середніх величин та надійного інтервалу.

Запропонований інформативний індекс апоптозно-регенеративної здатності гепатоцитів (ІАРРГ) визначають за формулою:

$$ІАРРГ = \frac{|TNF\alpha - HGF|}{HGF}, \text{ де}$$

ІАРРГ - індекс апоптозно-регенеративної здатності гепатоцита;

$TNF\alpha$ - рівень фактора некрозу пухлин-альфа, пкмоль/л, в ЕДТА-плазмі людини;

HGF - рівень фактора росту гепатоцита, пкмоль/л, в ЕДТА-плазмі людини,

і при значеннях ІАРРГ від 0,85 до 0,97 визначають, що напруженість апоптозу і регенерації гепатоцита знаходиться в межах норми і прогноз щодо функціонування та життєздатності печінкової тканини є сприятливим,

при значеннях ІАРРГ від 0,39 до 0,56 визначають, що відбуваються, переважно, процеси регенерації гепатоцитів і прогноз щодо функціонування та життєздатності печінкової тканини є умовно сприятливим,

при значеннях ІАРРГ від 0,971 до 2,43 визначають, що відбуваються процеси апоптозу та переродження клітинної маси в сполучну тканину при гепатиті і прогноз щодо функціонування та життєздатності печінкової тканини не є сприятливим.

Приклад конкретно застосування способу.

Було обстежено 45 дітей: 15 дітей здорових (контрольна група), без ознак будь-якої патології; 20 дітей, хворих на хронічний холецистохолангіт із ознаками порушення функціональної здатності печінки (I дослідна група); 10 дітей із хронічним вірусним гепатитом В, активна фаза, із ознаками трансформації в цироз (II дослідна група).

Аналізуючи отримані дані (табл. 1), у здорових дітей, рівень ростового фактора гепатоцита знаходиться в межах від 480 до 600 пкмоль/л, при цьому рівень фактора некрозу пухлин дорівнює від 15 до 32 пкмоль/л. Ці результати вказують на задовільний рівень відновлювальної здатності гепатоцитів і низький рівень апоптичної активності гепатоцитів, що є прийнятним для дитячого організму і засвідчують активний його ріст. При цьому запропонований індекс ІАРРГ становить в межах 0,93-0,97.

Таблиця 1

Рівень показників фактора росту гепатоцита, фактора некрозу пухлин-альфа та індексу апоптично-регенераторної реактивності гепатоцитів у дітей досліджуваних груп

Групи обстежених дітей	ФРГ, пкмоль/л	TNF α , пкмоль/л	IAPPG
Контрольна група (n=15)	532,733 \pm 52,372	24,693 \pm 8,918	0,95 \pm 0,02
I дослідна група (n=20)	1110,995 \pm 132,746	445,205 \pm 118,260	0,57 \pm 0,11
II дослідна група (n=10)	427,190 \pm 89,714	957,260 \pm 108,779	1,85 \pm 0,52

У дітей I групи із хронічним запаленням жовчного міхура і жовчовидільних шляхів відмічається зростання ростового фактора у два рази в порівнянні із групою контролю. Рівень фактора росту гепатоцита становить в межах від 950 до 1250 пкмоль/л. Також відмічається значне зростання рівня фактора некрозу пухлин, який перевищує, рівень в порівнянні із здоровими дітьми, у 20 разів. Співвідношення представлених факторів із визначенням IAPPG дорівнює від 0,46 до 0,68. Такі результати вказують на напруження регенераторної та апоптичної ланки функціонування гепатоцитів, що розцінюється як ознаки хронічного запального процесу холангіоцитів. Відбувається активний мітоз та ріст нових гепатоцитів та загибель пошкоджених клітин під впливом запального процесу.

Протилежно інша картина простежується у дітей із хронічним вірусним гепатитом активної фази із ознаками циротичної трансформації. Так рівень фактора росту гепатоцита падає в порівнянні із дітьми групи контролю і становить в межах 427,2 \pm 89,7 пкмоль/л проти 532,7 \pm 52,4 пкмоль/л відповідно. Проте різко зростає значення фактору некрозу пухлин-альфа до рівня 957,3 \pm 108,8 пкмоль/л проти 24,7 \pm 8,9 пкмоль/л. Визначений IAPPG становить в цій групі від 1,33 до 2,37. Отримання вище описаних результатів вказує на прогностично несприятливий перебіг захворювання, руйнування гепатоцитів із трансформацією їх в цироз.

Спосіб проведення визначення індексу апоптозно-регенеративної здатності гепатоцита технічно простий. Може проводитися у клінічних умовах, дозволяє швидко оцінити відновлювальну здатність гепатоцитів та ймовірність розвитку цирозу у дітей із хронічним вірусним гепатитом.

Таким чином вивчення запропонованого індексу дозволяє виявити ураження печінки та спрогнозувати подальший перебіг захворювання.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб прогнозування змін печінкової тканини у дітей, що включає визначення рівнів цитокінів TNF α та HGF та розрахунок індексу апоптозно-регенераторної реактивності гепатоцитів (IAPPG) за формулою:

$$IAPPG = \frac{|TNF\alpha - HGF|}{HGF}, \text{ де}$$

IAPPG - індекс апоптозно-регенеративної здатності гепатоцита;

TNF α - рівень фактора некрозу пухлин-альфа, пкмоль/л, в ЕДТА-плазмі людини;

HGF - рівень фактора росту гепатоцита, пкмоль/л, в ЕДТА-плазмі людини,

і при значеннях IAPPG від 0,85 до 0,97 визначають, що напруженість апоптозу і регенерації гепатоцита знаходиться в межах норми і прогноз щодо функціонування та життєздатності печінкової тканини є сприятливим,

при значеннях IAPPG від 0,39 до 0,56 визначають, що відбуваються, переважно, процеси регенерації гепатоцитів і прогноз щодо функціонування та життєздатності печінкової тканини є умовно сприятливим,

при значеннях IAPPG від 0,971 до 2,43 визначають, що відбуваються процеси апоптозу та переродження клітинної маси в сполучну тканину при гепатиті і прогноз щодо функціонування та життєздатності печінкової тканини не є сприятливим.

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

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