



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **110302** (13) **C2**
(51) МПК (2015.01)
A61B 10/00
G01N 33/48 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

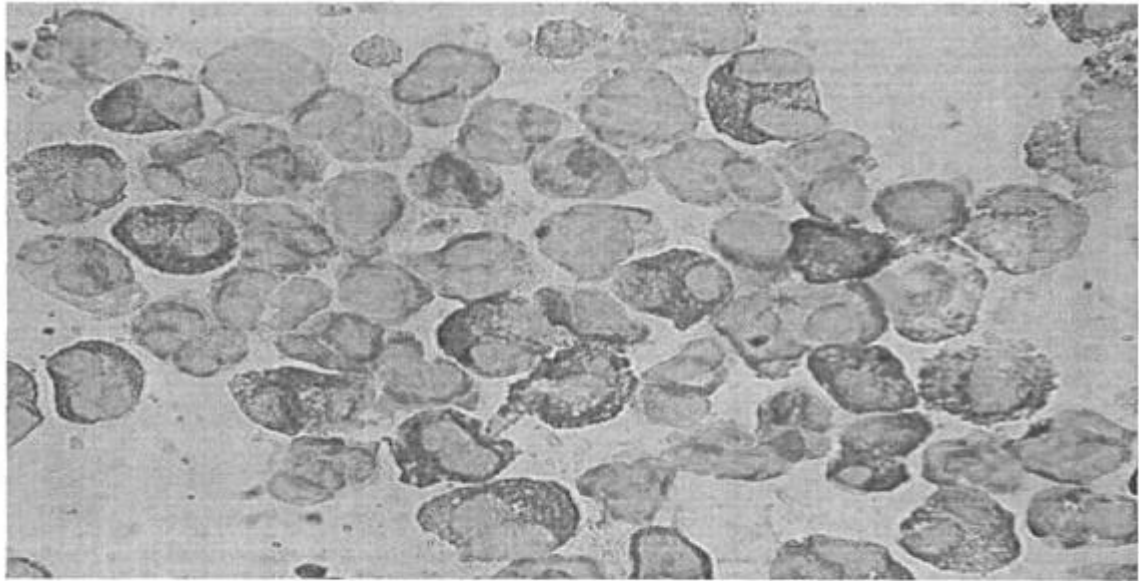
(21) Номер заявки: а 2014 12441	(72) Винахідник(и): Антипкін Юрій Геннадійович (UA), Лапшин Володимир Федорович (UA), Уманець Тетяна Рудольфівна (UA), Задорожна Тамара Данилівна (UA), Пустовалова Ольга Іванівна (UA), Кондратенкова Тетяна Володимирівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 19.11.2014	(73) Власник(и): ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ПЕДІАТРІЇ, АКУШЕРСТВА І ГІНЕКОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ", вул. Платона Майбороди, 8, м. Київ, 04050 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 10.12.2015	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: UA 35249 A, 15.03.2001 UA 101856 C2, 13.05.2013 UA 7066 U, 15.06.2005 RU 2195666 C2, 13.09.2000 Гусєва Е.Д., Ареф'єва Н.А. Иммунориноцитологические показатели у детей с аллергическим ринитом и бронхиальной астмой // Российская ринология. - 2010. - № 3. - С. 7
(41) Публікація відомостей про заявку: 10.04.2015, Бюл.№ 7	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.12.2015, Бюл.№ 23	

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ АЛЕРГІЧНОГО РИНІТУ, ПОЄДНАНОГО З БРОНХІАЛЬНОЮ АСТМОЮ, У ДІТЕЙ

(57) Реферат:

Винахід належить до галузі медицини, зокрема педіатрії, дитячої алергології та отоларингології, і може бути використаний у медичній практиці для діагностики та моніторингу лікування алергічного риніту у дітей з бронхіальною астмою. Спосіб діагностики алергічного риніту, поєднаного з бронхіальною астмою, у дітей включає дослідження еозинофілів назального секрету та визначення експресії антигенів до IgE на клітинах запальної інфільтрації, причому збільшення кількості еозинофілів більш ніж 15,0 % і визначення ступеня експресії антигенів до IgE ≥ 2 бали свідчить про наявність алергічного риніту, поєднаного з бронхіальною астмою.

UA 110302 C2



Малюнок 2. Мазок назального секрету дитини з БА та АР. Виразна експресія антигенів до IgE в мембранних структурах цитоплазми еозинофілів (3 бала). Ок.10,об.100.

Винахід належить до галузі медицини, зокрема педіатрії, дитячої алергології та отоларингології, і може бути використаний у медичній практиці для діагностики та моніторингу лікування алергічного риніту (АР) у дітей з бронхіальною астмою (БА).

Одним із коморбідних станів БА у дітей є алергічний риніт. Враховуючи, що у 80 % дітей з БА реєструється АР, а у 40 % з АР - формується БА, з сучасних позицій АР вважається важливим фактором ризику формування БА. Крім того, наявність супутнього АР у дітей суттєво впливає на тяжкість перебігу БА, рівень її контролю та значно погіршує якість життя хворих дітей. Тому удосконалення методів ранньої діагностики АР у дітей з БА буде сприяти своєчасному виявленню та лікуванню цієї категорії дітей.

Алергічний риніт - це хронічне захворювання слизової оболонки порожнини носа, в основі якого лежить IgE - залежне алергічне запалення, обумовлене дією різних алергенів, що клінічно характеризується появою свербіжів в носі, приступами чхання, ринореєю, закладанням носа.

Головними учасниками алергічного запалення в слизовій оболонці носа є еозинофіли, тучні клітини, лімфоцити, базофіли та ендотеліальні клітини. Участь цих клітин визначає розвиток ранньої та пізньої фази алергічної реакції.

Оцінка запального процесу в верхніх дихальних шляхах в сучасних умовах неможлива без цитологічних та імуноцитохімічних досліджень, так як відкриває широкі можливості для поглибленого вивчення стану слизової респіраторного тракту та біомаркерів запалення. Матеріалом для цих досліджень є назальний лаваж, мазки - відбитки слизової оболонки, а також біопсійний матеріал, який потребує застосування інвазивних методик. Однак, у дитячому віці перевагу повинні мати неінвазивні методи дослідження.

Цитологічне дослідження назального секрету є одним з важливих діагностичних методів в ринології, якій дозволяє диференціювати тип запалення при різних формах риніту (алергічному, неалергічному, інфекційному та запальному). Метод дослідження назального секрету вперше був запропонований ще в 1889 році при дослідженні пацієнтів з БА. Однак, до теперішнього часу існують лише окремі дослідження в педіатричній популяції хворих.

Легкість виконання, неінвазивність, низька вартість дослідження дозволяє багатократно отримувати матеріал для дослідження, визначати зміни запального профілю у відповідь на вплив різних етіологічних чинників та на лікування (моніторинг терапії).

Відомі способи діагностики АР, які базуються на застосуванні різних технік забору назального секрету та його обробки, інструментальних методів (лазерної доплеровської флоуметрії, визначенні оксиду азоту), визначенні різних імунологічних маркерів запалення, застосуванні провокаційних тестів, що впливають на доступність виконання досліджень, тривалість та його вартість. Спосіб діагностики алергічного риніту, поєднаного з бронхіальною астмою, пат. 35249 А UA, однак цей спосіб базується на визначенні кількості еозинофілів у назальному змиві та вивченні їх функціональної активності. Проте збільшення кількості еозинофілів спостерігається і у здорових людей. Також відомий: спосіб оцінки тяжкості перебігу алергічного риніту у дітей, пат. 11402 UA, однак цей метод є інвазивним тому, що потребує забору венозної крові.

Найбільш близьким за технічною суттю є спосіб оцінки алергічного запалення у дітей з АР, поєднаного з бронхіальною астмою (Гусєва Е.Д., Ареф'єва Н.А. Иммунориноцитологические показатели у детей с аллергическим ринитом и бронхиальной астмой // Российская ринология. - 2010. - № 3. - С. 7). Основу способу складає збір алергологічного анамнезу, огляд отоларинголога, алерголога, цитологічне дослідження назального секрету та визначення сироваткового IgE.

Недоліком запропонованого способу є те, що:

- назальна еозинофілія може вважатися лише можливою, але не обов'язковою ознакою АР. За даними літератури у 20,0 % здорових людей може визначатись назальна еозинофілія. Крім того, існує форма неалергічного риніту з еозинофільним синдромом, якій може асоціюватися з БА як у дорослих так і дітей. Назальна еозинофілія визначається у дітей з БА без клінічних симптомів АР.

- системні ознаки atopії (підвищення концентрації сироваткового IgE) не завжди визначаються при АР. В сучасній доступній літературі науковцями все більше уваги приділяється локальному алергічному запаленню, т. з. феномену "ентопії" (локальній продукції IgE в порожнині носа).

- інвазивність способу (визначення сироваткового IgE потребує забору венозної крові).

В основу запропонованого способу діагностики АР, поєднаного з бронхіальною астмою, у дітей покладена задача підвищення достовірності, точності та інформативності оцінки алергічного запалення слизової носа, що дозволить поліпшити ранню діагностику запальних

змін у дітей з даною патологією та проводити динамічне спостереження за розвитком хвороби та ефективністю лікування.

Поставлена задача способу діагностики алергічного риніту, поєднаного з бронхіальною астмою у дітей, що включає дослідження еозинофілів назального секрету і визначення експресії антигенів до IgE на клітинах запальної інфільтрації, причому збільшення кількості еозинофілів більш ніж 15,0 % і визначення ступеня експресії антигенів до IgE ≥ 2 бали свідчить про наявність алергічного риніту, поєднаного з бронхіальною астмою.

Причинно-наслідковий зв'язок заявлених маркерних показників з позитивним результатом, що досягається полягає в наступному: як відомо, алергічна реакція розвивається лише в сенсibilізованому організмі при повторному контакті з алергеном і супроводжується розвитком алергічного запалення. Участь еозинофілів, тучних клітин, лімфоцитів, базофілів та ендотеліальних клітин визначає розвиток ранньої та пізньої фази алергічної реакції. В фазі сенсibilізації плазматичні клітини слизових оболонок носа декретують IgE, який фіксується на високоактивних рецепторах мастоцитів. В ранню фазу алергічної реакції виникає зв'язування алергену із специфічними IgE, що призводить до дегрануляції мастоцитів і виділення медіаторів запалення, які, діючи на ефекторні клітини, викликають симптоми АР. Важливу роль у підтримці алергічного запалення в пізню фазу алергічної реакції відіграють еозинофіли, кількість яких у слизовій оболонці носа збільшується.

Суть способу вирішується наступним чином:

Пацієнту проводиться збір алергологічного анамнезу, огляд алерголога і отоларинголога, алергологічне обстеження, а також цитологічне та імуноцитохімічне дослідження назального секрету із застосуванням мазка -відбитка. Мазок - відбиток з слизової носа отримують шляхом забору слизу з нижнього носового ходу скляною паличкою, обгорнутою стерильним ватним тампоном. Отриманий слиз наносять на два предметних скла і висушують. Одне предметне скло забарвлюють за Романовським-Гімзе, підраховують процентне співвідношення клітинних елементів на 100 несквामозних клітин у полі зору за допомогою імерсійної мікроскопії.

Друге предметне скло використовують для імуноцитохімічного дослідження. Імуноцитохімічне дослідження включає виявлення ступеня експресії антигенів до IgE на клітинних мембранах багатошарового плоского епітелію і клітинах запальної інфільтрації (нейтрофілах, лімфоцитах, еозинофілах, макрофагах).

Протокол забарвлення: фіксація мазків після заморозки (-20 °C) в 3ФА (забуферений формалін-ацетон), блокування ендогенною пероксидазою або 3 % розчином пероксида водню, обробка предметного скла водою, блокування неспецифічних протеїнових сполук двома краплями 1 % BSA (бичачий сироватковий антиген), промивка в PBS-буфері (фосфатний буфер, pH - 7,4), нанесення первинних антитіл до зазначених антигенів відповідно на одну годину. Промивка в PBS-буфері і нанесення вторинних антитіл. Промивка в PBS-буфері, нанесення двох крапель комплексу стрептавидін-пероксидази та інкубація на протязі 30 хвилин, промивка і нанесення АЕС (аміноетилкарбазол-хромоген-розчину) - інкубація від 5 до 20 хв., до появи забарвлення.

Оцінка результатів імуноцитохімічної реакції здійснюється за допомогою визначення ступеня експресії (в балах): 0 балів - немає забарвлення; 1 бал - слабе забарвлення; 2 бали - помірне забарвлення; 3 бали - виражене забарвлення; 4 - бали - дуже виражене забарвлення; та у відсотках, які визначались як кількість позитивно зафарбованих клітин на 100 клітин в полі зору (рахують в 10 полях зору).

Нами по запропонованому способу обстежено 68 дітей з бронхіальною астмою, 42 дитини з бронхіальною астмою поєднаною з алергічним ринітом, 22 дитини з алергічним ринітом та 96 практично здорових дітей. Отримані дані представлені в таблиці.

Таблиця

Цитологічний склад клітинних елементів та експресія IgE в мазках - відбитках слизової носа у обстежених дітей.

Показники	Здорові діти, n=96	Діти з БА+АР, n=42	Діти з БА, n=68	Діти з АР, n=22
клітини мазків-відбитків слизової носа, (%):				
епітелій	68,0±2,4	39,4±1,6	42,3±1,6	35,3±1,6
нейтрофіли	25,0±1,3	33,0±1,2	35,9±1,2	33,2±1,4
лімфоцити	4,1±1,1	(2,8±0,1)*	(3,2±0,1)*	(4,2±0,1)*
еозинофіли	0,2±0,07	(18,2±0,03)*	(7,4±0,03)*, **	(17,1±0,03)*, **
базофіли	0,9±0,05	(1,2±0,02)*	(2,1±0,02)*	(1,9±0,02)*
макрофаги	2,8±0,08	(5,8±0,2)*	(9,1±0,2)*	(8,3±0,02)*
експресія IgE, (середній бал)	0,0	2,3	0,8	2,1

Примітки:

1. - * P <0,05 порівняно з групою контролю

2. - ** P <0,05 порівняно з групою БА+АР

n - кількість обстежених дітей

Суть заявленого способу пояснюється прикладами.

Приклад 1

5 Дитина Д. А., 2007 року народження знаходилась на обстеженні у відділенні захворювань органів дихання ДУ "ІПАГ НАМН України" з діагнозом бронхіальна астма, atopічна форма, персистуючий перебіг, середнього ступеня тяжкості. Алергічний персистуючий риніт середнього ступеня тяжкості. Атопічний дерматит, легкий перебіг, період ремісії (№ історії хвороби 2176).

10 За даними анамнезу дитина хворіє з 2 років, коли вперше на фоні гострої респіраторної інфекції з'явився бронхообструктивний синдром. Бронхіальна астма діагностована у 5 років. Прояви atopічного дерматиту з 6 місяців. Зі слів матері, висипання виникали після вживання червоних фруктів, шоколаду. Алергічний риніт діагностований у 4 роки, проявляється цілорічною закладеністю носа, періодичним чханням. Перинатальний анамнез без особливостей.

15 Під час перебування у клініці у хлопчика періодично спостерігався кашель, затруднене носове дихання. При об'єктивному обстеженні в легенях вислуховувалось жорстке дихання, розсіяні сухі свистячі хрипи з обох боків легень на форсованому видосі, при перкусії легень-ясний легеневиий звук. Загальноклінічні аналізи - в межах вікових норм. При проведенні прикестів виявлена сенсibiliзація до кліщів D. pteronissimus (6 × 11мм), D. farinae (10 × 8 мм). За даними спірометричного дослідження - функція зовнішнього дихання не порушена (ОФВ 121 %).

20 У риноцитограмі виявлено епітелію 39 % нейтрофілів 34 %, лімфоцитів 2 %, еозинофілів 18 %, базофілів 1 %, макрофагів 6 %. Дана риноцитограма відповідає еозинофільному фенотипу запалення. При проведенні імуноцитохімічної реакції експресія антигенів до IgE становить 2 бали.

25 Дитині призначене лікування фліксотидом 125 мкг по 1 вдоху 2 рази на день через аерочамблер 3 місяці, вентоліном 100 мкг при необхідності, назонексом 50 мкг по 1 впр. в ніс 1 раз на день 1 місяць.

Під час лікування було досягнуто контролю симптомів бронхіальної астми та зменшення симптомів риніту.

30 Приклад 2

Дитина Г. Н., 2008 року народження знаходилась на обстеженні та лікуванні у відділенні захворювань органів дихання ДУ «ІПАГ НАМН України» з діагнозом бронхіальна астма, atopічна форма, персистуючий перебіг, середнього ступеня тяжкості. Алергічний персистуючий риніт, середнього ступеня тяжкості (№ історії хвороби 2080).

35 З анамнезу відомо, що хлопчик хворіє з 4 років, коли вперше встановлений діагноз обструктивний бронхіт. Обструктивні бронхіти повторювались 3-4 рази на рік. До року

відмічались прояви atopічного дерматиту. Періодична закладеність носа була з 4 років. Перинатальний анамнез не обтяжений. У матері алергічна реакція на citrusові. Діагноз бронхіальна астма встановлений при обстеженні у відділенні.

5 Під час перебування у відділенні у дитини спостерігався продуктивний кашель, затруднене носове дихання. При об'єктивному обстеженні в легенях вислуховувалось жорстке дихання, розсіяні сухі свистячі хрипи з обох боків легень, при перкусії легень - ясний легеневи́й тон.

10 Загальноклінічні аналізи - в межах вікових норм. При проведенні прик-тестів виявлена сенсibiliзація до кліщів *D. pteronyssinus* (6 × 6 мм), *D. farinae* (3 × 3 мм), суміші кліщів (4 × 4 мм), весняний ранній суміші (4 × 4 мм), шерсті kota (5 × 5 мм), собаки (4 × 4 мм). За даними спірометричного дослідження спостерігалась вентиляційна недостатність по обструктивному типу 1 ст. на рівні дрібних та середніх бронхів. Тест на зворотність - 39 %. У риноцитограмі виявлено епітелію 40 %, нейтрофілів 33 %, лімфоцитів 2 %, еозинофілів 18 %, базофілів 1 %, макрофагів 6 %. При проведенні імуноцитохімічної реакції експресія антигенів до IgE становить 3 бали.

15 Дитині призначене базисне лікування згідно з протоколом.

Таким чином, використання запропонованого способу діагностики алергічного риніту, поєднаного з бронхіальною астмою, у дітей дозволяє розширити можливості його виконання на всіх етапах надання медичної допомоги, сприяти покращенню діагностики та моніторингу лікування дітей з даною патологією.

20 Джерела інформації:

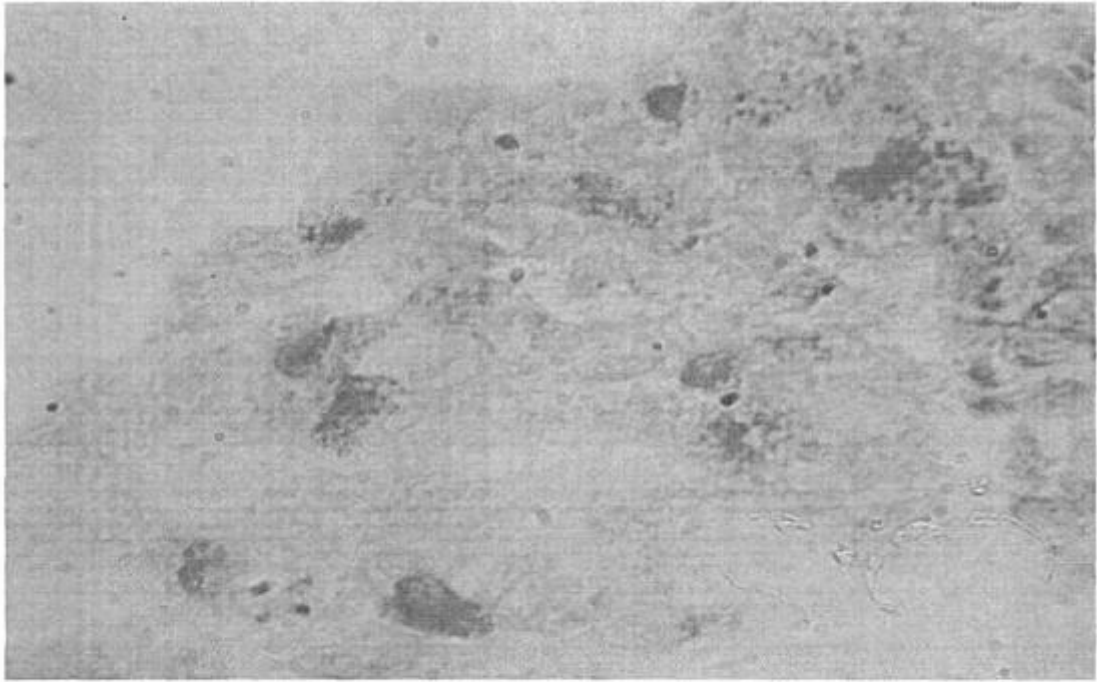
1. Гусева Е.Д. Иммунориноцитологические показатели у детей с аллергическим ринитом и бронхиальной астмой / Гусева Е.Д., Арефьева Н.А. // Российская ринология. - 2010. - № 3. -С. 7.

2. Пат. 35249 А UA, Спосіб діагностики алергічного риніту, поєднаного з бронхіальною астмою.

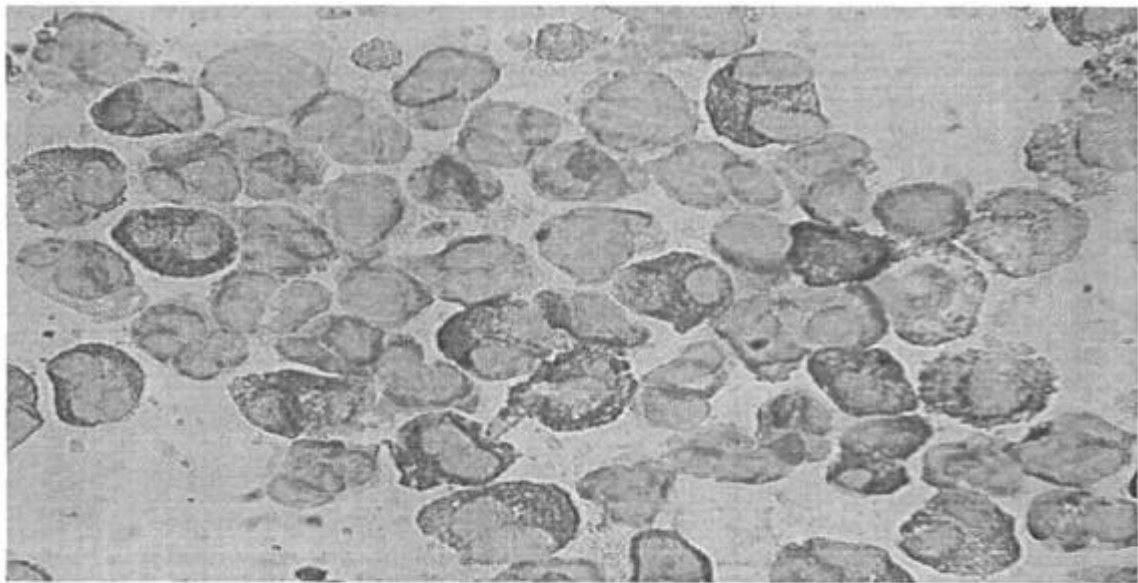
25 3. Пат. 11402 UA, Спосіб оцінки тяжкості перебігу алергічного риніту у дітей.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

30 Спосіб діагностики алергічного риніту, поєднаного з бронхіальною астмою, у дітей, що включає дослідження еозинофілів назального секрету, який **відрізняється** тим, що для оцінки алергічного запалення слизової носа додатково визначається експресія антигенів до IgE на клітинах запальної інфільтрації; причому збільшення кількості еозинофілів більш ніж 15,0 % і визначення ступеня експресії антигенів до IgE ≥ 2 бали свідчить про наявність алергічного риніту, поєднаного з бронхіальною астмою.



Фіг.1 Мазок назального секрету дитини з БА та АР. Помірна експресія антигенів до IgE в цитоплазмі лімфоцитів, еозинофілів та нейтрофілах (2 бала). Ок. 10, об. 100.



Фіг.2. Мазок назального секрету дитини з БА та АР. Виразна експресія антигенів до IgE в мембранних структурах цитоплазми еозинофілів (3 бала). Ок.10,об.100.

Комп'ютерна верстка Д. Шеверун

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

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