



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **96650** (13) **U**
(51) МПК (2015.01)
G01N 33/00
G09B 23/28 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2014 09854	(72) Винахідник(и): Фальфушинська Галина Іванівна (UA), Столяр Оксана Борисівна (UA), Шульгай Аркадій Гаврилович (UA), Гнатишина Леся Любомирівна (UA), Шідловський Олександр Вікторович (UA)
(22) Дата подання заявки: 08.09.2014	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.02.2015	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.02.2015, Бюл.№ 3	(73) Власник(и): ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД "ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО МОЗ УКРАЇНИ", Майдан Волі, 1, м. Тернопіль, 46001 (UA)

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУ ВУЗЛОУТВОРЕННЯ У ТКАНИНІ ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ ЛЮДИНИ

(57) Реферат:

Спосіб прогнозу вузлоутворення у тканині щитоподібної залози людини включає діагностику йододефіцитного вузлового колоїдного зобу та прогноз небезпеки утворення вузлів. Обчислюють співвідношення каталазної активності до суми активності катепсину Д та рівня фрагментації ДНК у тканині щитоподібної залози або сироватці крові людини та класифікують відповідь організму як норма, відсутність патологічних змін у залозі або поява змін у структурі паренхіми зобно-зміненої тканини щитоподібної залози залежно від величини цього співвідношення і варіабельності абсолютного рівня його складових відносно запропонованих референтних значень.

UA 96650 U

Корисна модель належить до області медицини, а саме медичної біохімії та ендокринології, і може бути використана для діагностики вузлового колоїдного зобу, функціонального стану щитоподібної залози, прогнозу небезпеки утворення вузлів та профілактики розвитку зобу.

Відомий спосіб оцінки стану щитоподібної залози у дітей раннього віку (RU (11) 2269298 (13) CI), який полягає у проведенні ультразвукового дослідження і визначенні тиреоїдного об'єму. Для оцінки гіперплазії або гіпоплазії щитоподібної залози пропонується розрахувати масу залози і виміряти масу дитини. Визначають коефіцієнт відношення маси залози до маси дитини, за яким і оцінюють стан щитоподібної залози.

Відомий також подібний спосіб діагностики зобу і гіпоплазії щитоподібної залози у дітей (патент РФ № 2116752, автори Касаткіна Е.П., Шилін Д.Є., Пиков М.І.). Спосіб ґрунтується на проведенні ультразвукового дослідження, визначенні тиреоїдного об'єму і порівнянні параметрів зі значенням індивідуальної норми, яка обчислюється за антропометричними показниками з подальшою діагностикою зоба.

Недоліками цих способів є обмежений набір методів для дослідження щитоподібної залози, який не може забезпечити адекватної інформації для ранньої діагностики функціональної здатності залози.

Відомий спосіб диференційної діагностики вузлового зобу, кіст і пухлин щитоподібної залози методом радіоізотопного сканування, який ґрунтується на селективному захопленні радіоактивного ізотопу йоду I^{131} нормальною і пухлино-зміненою тканиною щитоподібної залози. У трансформованій тканині («холодні» вузли) виникає «дефект» накопичення ізотопу.

Недоліком методу є те, що феномен накопичення радіоактивного ізотопу не завжди дозволяє диференціювати вузловий зоб, кісту і пухлини щитоподібної залози, що було виявлено D. Honore зі співавт. (1975) при аналізі вибірки 300 хворих.

Відомий спосіб диференційної діагностики вузлового зобу методом ультразвукового дослідження, заснований на різній швидкості поширення ультразвуку в тканинах організму. Недоліком методу є те, що подібні ехо-ознаки можуть спостерігатися при вузловому зобі, кістах і пухлинах щитоподібної залози.

Відомий спосіб прогнозування дифузного нетоксичного зобу у дітей, які проживають в екологічно несприятливих регіонах (RU (11) 2157543 (13) CI, автори Утеніна В.В., Боев В.М.; Касаткіна Е.П., Барішева О.С.). Для цього у сироватці крові пацієнта визначають спектр мікроелементів, специфічних для кожного регіону. На підставі зниження вмісту есенціальних мікроелементів і перевищення гранично допустимих концентрацій умовно есенціальних і токсичних мікроелементів порівняно з нормативами судять про можливий ризик розвитку зобу. Отримані результати порівнюють з нормами вмісту мікроелементів в сироватці крові по Дж. Емслі (1993) і на підставі кількісного зменшення вмісту в сироватці крові Fe, Mn, Co, Zn та підвищення Ni та Sr відносять дітей до групи ризику за ймовірністю розвитку зобу.

Недоліками цього способу є умовна прив'язаність класифікації есенціальний/токсичний метал до певного регіону, умовність кількісних критеріїв, недостатнє обґрунтування варіабельності середнього значення вмісту металів у сироватці крові пацієнтів залежно від ступеню патологічного процесу у залозі, визначення показників у сироватці крові, а не у тканині.

Найближчим до пропонованого способу вважаємо спосіб оцінки функціонального стану щитоподібної залози (див. патент РФ RU 2328746, заявники Коновалов В.О., Зубєєв П.С., Бавріна А.П., Жуков М.О., Конторщикова К.М.), що включає визначення рівня окисних модифікацій білків за рівнем карбонільних похідних нейтрального та основного характеру, а також вмісту первинних продуктів перекисного окислення ліпідів, дієнових і трієнових кон'югатів і основ Шиффа у рідкій частині пунктату вузлів щитоподібної залози. Залежно від сукупності значень вузли щитоподібної залози класифікують як функціонально активні («гарячі») або функціонально неактивні («холодні»).

Недоліками способу є неповнота аналізу функціональної активності залози лише за визначенням окремих прооксидантних проявів. На нашу думку, це не дозволяє зробити однозначні висновки про ступінь толерантності та адаптивну здатність стресочутливих систем щитоподібної залози людини за прогресування патологічного процесу.

Йододефіцитні захворювання відносяться до числа найбільш поширених неінфекційних захворювань людини. Нестача йоду призводить до розладів репродуктивної системи, кретинізму, ендемічного зобу, причому останній займає чільне місце з-поміж йододефіцитної патології. За даними ВООЗ на ендемічний зоб страждає близько 7 % населення планети. У зв'язку з цим питання диференційної діагностики, прогнозу та вибору клініко-морфологічних критеріїв функціональної автономії і прогресування зростання вузлів являють собою актуальну проблему сучасної медичної біохімії, клінічної ендокринології, хірургії та онкології.

Позаяк одним з найбільш універсальних механізмів розвитку патологічних станів є надмірне утворення вільних радикалів, основна увага при визначенні функціонального стану щитоподібної залози за розвитку гіпо- та гіпертиреозу, канцерогенезу надається показникам окисного стресу, тоді як оцінка збалансованості системи антиоксидантного захисту та ступеню

ураження відсутні. За такого спрощеного підходу поза увагою залишаються наслідки окисного ушкодження та інтегративне розуміння механізмів прогресування патологічного процесу (Фальфушинська та ін., 2011, 2014, Falfushynska et al., 2014).

В основу корисної моделі поставлено задачу створення способу прогнозування утворення вузлів у зобно-зміненій тканині щитоподібної залози людини за умов ендемічного йододефіциту на підставі визначення мінімального набору біохімічних показників у крові та/або біоматеріалі

тканини залози.

Поставлена задача вирішується тим, що на основі визначення активності лізосомальної аспартильної протеази катепсину Д, рівня фрагментації ланцюгів ДНК та активності антиоксидантного ензиму каталази (КАТ) у біологічному матеріалі тканини щитоподібної залози людини та/або сироватці крові обчислюється співвідношення активності каталази/(активність катепсину Д + рівень фрагментації ДНК). Відповідь організму класифікується як норма або зміни в структурі паренхіми залози, або утворення вузла. Поєднане визначення показників системи антиоксидантного захисту (каталазна активність), цитотоксичності (активність катепсину Д) та генотоксичності (рівень фрагментації ДНК) та обчислення їх співвідношення становить важливий діагностичний інструмент для прогнозування вузлоутворення. Значення співвідношення показників активності каталази/(активність катепсину Д + рівень фрагментації ДНК) $>10,0$ відповідає відсутності патологічних змін у тканині щитоподібної залози. Якщо активність каталази /(активність катепсину Д + рівень фрагментації ДНК) $<10,0$ - у структурі зобно-зміненої тканини щитоподібної залози відбувається процес вузлоутворення, проявляються суб- або декомпенсаторні зміни.

Запропонований спосіб здійснюється наступним чином: У пацієнта відбирають 1 мл крові або інтраопераційно частки тканини щитоподібної залози масою 220-250 мг, які використовують в подальшому для біохімічного аналізу. У досліджуваних зразках визначають каталазну активність, загальну активність катепсину Д, рівень фрагментації ДНК та обраховують співвідношення показників за формулою активність каталази /(активність катепсину Д + рівень фрагментації ДНК).

Матеріалом для досліджень були зразки сироватки крові осіб, які в анамнезі не мали патології щитоподібної залози, зразки сироватки крові та післяопераційні препарати часток щитоподібної залози 25 хворих, оперованих з приводу однобічного йододефіцитного вузлового колоїдного зоба на базі хірургічного відділення міської клінічної лікарні швидкої допомоги м. Тернополя. Відбирали тканину вузла, паранодулярної (навколовузлової) макроскопічно не зміненої тканини) та контрлатеральної (не ураженої вузлом тканини) частки щитоподібної залози. Всі обстежені пацієнти були мешканцями регіону дефіциту йоду середнього ступеню важкості. Всі дослідження проводились у відповідності до ухвали Першого національного конгресу з біоетики (Київ, 2000) та рішення комісії з біоетики Тернопільського державного медичного університету ім. І.Я. Горбачевського.

Всі процедури по обробці тканин проводили на холоді. Всі реактиви, крім нижче зазначених, були фірми "Синбіас" кваліфікації "хч".

Активність каталази визначають у розчинній фазі гомогенату або сироватці крові за методом, який ґрунтується на зменшенні оптичної густини при 240 нм при розкладі пероксиду гідрогену під впливом каталази (Aebi et al., 1984). Досліджувана суміш містить 5 мкл розчинної фази (супернатанту) гомогенату щитоподібної залози або відповідну аліквоту сироватки крові у 50 мМ К-фосфатному буфері, рН 7,4 в присутності 15 мМ гідроген пероксиду H_2O_2 (50 мкл) в загальному об'ємі 3,0 мл (2,9 мл 50 мМ К-фосфатного буферу, рН 7,4). Реакцію ініціюють додаванням супернатанту і вимірюють світлопоглинання при 240 нм з 30-секундним інтервалом на спектрофотометрі з УФ-фільтром. Активність каталази обчислюють за мілімолярним коефіцієнтом світлопоглинання пероксиду гідрогену ($\epsilon = -0,04 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) і виражають в мкмоль/(мг розчинного білка \times хв.).

Пошкодження ДНК визначають як розриви ланцюгів депротейнізованої ДНК методом лужного осадження в 10 % гомогенаті тканини або сироватки крові в 50 мМ трис-ЕДТА буферному розчині рН 8,0, що містить 0,5% натрію додецил сульфат (SDS) при хвилі збудження (ex.) = 360 нм та випромінювання (em.) = 450 нм на флуоресцентному мікропланшетному рідері або спектрофотометрі (Olive et al., 1988). 50 мг тканини гомогенізують в або 50 мкл сироватки крові змішують з 0,5 мл 50 мМ трис-ЕДТА буферу рН 8,0, що містить 0,5 % SDS. Після цього відбирають 250 мкл гомогенату та додають 250 мкл суміші 2% SDS + 10 мМ ЕДТА + 40 мМ

NaOH + 10 мМ трис. Через 1 хв. до інкубаційної суміші додають 125 мкл 0,2 М KCl та інкубують протягом 10 хв. при 60 °С. Після термообробки проби переносять в морозильну камеру на 20 хв., після чого центрифугують 15 хв. при 6000 g. Для дослідження відбирають 100 мкл супернатанту, а також 100 мкл осаду, розчиненого в 1 мл гарячої води (65 °С). Вміст ДНК (депротейнізованої форми та в осаді) визначають за допомогою барвника Hoescht (Sigma) в присутності 0,4 М NaCl, 4 мМ натрій холату та 0,1 М трис (pH 9,0), для запобігання проникнення слідових кількостей SDS у супернатант. Для приготування калібрувального розчину використовують комерційний препарат ДНК (Sigma) 1 мг/мл в 10 мМ трис-ЕДТА буферу, pH 8,0. Флуоресценцію реєструють при хвилі збудження (ex.) = 360 нм та випромінювання (em.) = 450 нм одразу та через 15 хв. інкубації в темряві.

Загальну активність катепсину Д визначають спектрофотометрично за кількістю утвореного тирозину у 50 % гомогенаті тканини або сироватці крові за модифікованим методом Dingle J. T. (197Г). Метод ґрунтується на спектрофотометричному визначенні кислоторозчинних продуктів ферментативного гідролізу гемоглобіну при довжині хвилі 240 нм. Інкубацію проб проводили при 37 °С протягом 30 хв. Ферментну реакцію зупиняють додаванням 10 % розчину трихлороацетатної кислоти з наступним центрифугуванням за 4 000 об/хв.. протягом 10 хв. Для визначення загальної активності катепсину Д проби попередньо обробляють 1 % розчином тритону X-100 при 37 °С протягом 10 хв. Активність ферменту виражають у нмоль тирозину / (хв.·г тканини) або нмоль / (хв.·мл крові).

Для тканини щитоподібної залози людини референтні значення активності каталази становлять $14,2 \pm 5,8$ мкмоль/(хв.·мг білка), рівня фрагментації ДНК - $1,0 \pm 0,3$ %, загальної активності катепсину Д - $0,30 \pm 0,11$ нмоль / (хв.тканини), для сироватки крові референтні значення відповідних показників становлять - $67,6 \pm 7,5$ мкмоль/(хв·мг білка), $2,7 \pm 0,2$ % та $1,2 \pm 0,2$ нмоль / (хв·мл крові).

Кваліфікують біологічну відповідь і, відповідно, функціональний стан щитоподібної залози як:

- "норма" - значення співвідношення каталазної активності до суми (активність катепсину Д + рівень фрагментації ДНК) $> 10,0$; абсолютні значення показників варіюють в діапазоні 20% від наведених референтних значень;

- "зміни в структурі паренхіми залози" - відбувається процес утворення вузла у зобнозміненій тканині щитоподібної залози, співвідношення показників КАТ/(активність катепсину Д + рівень фрагментації ДНК) становить менше 10,0;

Якщо активність катепсину Д < 1 нмоль / (хв·г тканини), а активність каталази не перевищує референтні показники більш ніж вдвічі, зміни розцінюємо як субкомпенсаторні. Для диференціальної діагностики додатково рекомендуємо цитологічні дослідження;

Якщо активність катепсину Д > 1 нмоль / (хв·г тканини), а активність каталази в рази перевищує референтні показники, зміни у тканині щитоподібної залози розцінюємо як декомпенсаторні. Для диференціальної діагностики додатково рекомендуємо цитологічні дослідження.

Реалізація корисної моделі проілюстрована на прикладах оцінки функціонального стану щитоподібної залози на підставі визначення співвідношення активність каталази/(активність катепсину Д + рівень фрагментації ДНК) у зразках біологічного матеріалу тканини залози та крові людини.

Приклад 1. Порівнювали співвідношення показників активність каталази / (активність катепсину Д + рівень фрагментації ДНК) у тканині щитоподібної залози осіб, які в анамнезі не містили патології щитоподібної залози (К-група) та хворих на йододефіцитний вузловий колоїдний зоб. Одержані результати представлені в таблиці 1.

Таблиця 1

Оцінка функціонального стану щитоподібної залози людини на підставі визначення співвідношення активність каталази/(активність катепсину Д + рівень фрагментації ДНК) у біоматеріалі щитоподібної залози людини, $M \pm SD$, $n=25$

Показник	Групи обстежуваних			
	К	Вузловий йододефіцитний ендемічний колоїдний зоб		
		Контрлатеральна частка	Паранодулярна тканина	Вузол
Активність каталази, мкмоль/(хв•мг білка)	14,2±5,8	30,4±4,0 ^a	24,8±4,0 ^{a,b}	59,0±6,2 ^{a,b,c}
Фрагментація ланцюгів ДНК, %	1,0±0,3	6,2±0,6 ^a	6,8±0,5 ^a	7,6±0,5 ^{a,b}
Загальна активність катепсину Д, нмоль/(хвт тканини)	0,30±0,11	0,86±0,10 ^a	1,59±0,18 ^{a,b}	2,13±0,22 ^{a,b,c}
КАТ/(катепсин Д+фрагментація ДНК)	10,9	4,3	3,0	6,1

Примітка. Тут і в таблиці 2: а - відмінності показників вірогідні порівняно з контролем, b - відмінності показників вірогідні порівняно з тканиною контрлатеральної частки щитоподібної залози; c - відмінності показників вірогідні порівняно з паранодулярною тканиною щитоподібної залози.

Приклад 2. Порівнювали співвідношення показників активність каталази /(активність катепсину Д + рівень фрагментації ДНК) у сироватці крові осіб, які в анамнезі не містили патології щитоподібної залози (К-група) та хворих на йододефіцитний вузловий колоїдний зоб (ВКЗ-група). Одержані результати представлені в таблиці 2.

Таблиця 2

Оцінка функціонального стану щитоподібної залози на підставі визначення співвідношення активність каталази /(активність катепсину Д + рівень фрагментації ДНК) у сироватці крові людини, $M \pm SD$, $n=25$

Показник	Групи обстежуваних	
	К	ВКЗ
Активність каталази, мкмоль/(хв•мг білка)	67,6±7,5	89,1±9,2 ^a
Фрагментація ланцюгів ДНК, %	2,7±0,2	7,6±0,3 ^a
Загальна активність катепсину Д, нмоль/(хв•г тканини)	1,2±0,2	3,4±0,4 ^a
КАТ/(катепсин Д + фрагментація ДНК)	17,3	8,1

Вузли розвиваються у функціонально зміненій тканині залози на тлі виснаження компенсаторних можливостей гіпертрофованих тироцитів. У вузлі це проявляється як збільшення рівня ушкодження ДНК та апоптозу (за активністю катепсину Д).

Доведено, що апоптоз належить до головних детермінант прогресування патологічних станів. Як було показано, у хворих на зоб активність аспартильного катепсину Д, який залучається до процесингу тиреоглобуліну та належить до медіаторів IFN- γ та TNF- α індукованого лізосомального шляху програмованої загибелі клітини, зростає. Ймовірною причиною цього явища може бути окисне ушкодження тироцитів та збільшення вмісту редоксативної міді (Фальфушинська та ін., 2011, 2014), які викликають набрякання лізосом, активацію Са-залежної фосфоліпази A2 та детермінують підвищення пермеабілізації лізосомальних мембран. Це супроводжується прижиттєвим виходом ферментів із органели та є передумовою активації каспаз, фрагментації ДНК та апоптозу.

Міжгрупові відмінності абсолютних значень та співвідношення показників КАТ/(активність катепсину Д + рівень фрагментації ДНК) у крові та тканині щитоподібної залози осіб, які в анамнезі не мали патології щитоподібної залози та хворих на йододефіцитний вузловий колоїдний зоб співвідносяться з високим коефіцієнтом детермінації ($R^2=0,59$), що доводить можливість використання запропонованих показників крові для скринінгу процесу вузлоутворення у зобнозміненій тканині щитоподібної залози людини. У поєднанні з аналізом морфологічних змін у тиреоїдній паренхімі дані щодо проявів цито- та генотоксичності у тканині щитоподібної залози та/або крові дозволяють спрогнозувати ризик вузлоутворення у залозі. Це набуває ваги діагностично-значимого критерію у вирішенні питання тактики превентивної профілактики вузлоутворення та лікування хворих на вузловий колоїдний зоб.

Таким чином, спосіб дозволяє кількісно оцінити функціональні зміни у тканині щитоподібної залози та спрогнозувати прогресування патологічного процесу, може бути реалізований як при дослідженні зразків крові, біопунктів, так і часток тканини щитоподібної залози і застосований як у практиці клініко-лабораторних досліджень, так і в експериментальній ендокринології. Враховуючи, що дослідження проводяться безпосередньо у біоматеріалі тканини, результати є високоспецифічними та чутливими.

Література

Фальфушинська Г.І., Гнатишина Л.Л., Осадчук Д.В., Шідловський В.О., Столяр О.Б. Металодепонуюча функція та антиоксидантні властивості щитоподібної залози людей, хворих на йододефіцитний вузловий колоїдний зоб // Укр. біохім. журн. 2011. - Т. 83. № 6. - С 92-97.

Фальфушинська Г.І., Гнатишина Л.Л., Осадчук О.Й., Шідловський В.О., Столяр О.Б. Особливості депонування мікроелементів і функції металотіонеїнів у щитоподібній залозі людини за процесу зобної трансформації // Укр. біохім. журн. - 2014. - Т. 86. №3. - С. 108-114.

Falfushynska H., Gnatyshyna L., Turta O., Stoliar O., Milina N., Zaichenko A., Stoika R. Responses of hepatic metallothioneins and apoptotic activity in *Carassius auratus gibelio* witness a release of cobalt and zinc from waterborne nanoscale composites // Comp. Biochem. Physiol. - 2014. - Vol. 160. - С - Р. 66-74.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб прогнозу вузлоутворення у тканині щитоподібної залози людини, який включає діагностику йододефіцитного вузлового колоїдного зобу та прогноз небезпеки утворення вузлів, який **відрізняється** тим, що обчислюють співвідношення каталазної активності до суми активності катепсину Д та рівня фрагментації ДНК у тканині щитоподібної залози або сироватці крові людини та класифікують відповідь організму як норма, відсутність патологічних змін у залозі або поява змін у структурі паренхіми зобно-зміненої тканини щитоподібної залози залежно від величини цього співвідношення і варіабельності абсолютного рівня його складових відносно запропонованих референтних значень.

Комп'ютерна верстка Д. Шеверун

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