



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **144571** (13) **U**  
(51) МПК  
**G01N 33/50** (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ  
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА  
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

<p>(21) Номер заявки: <b>u 2020 02758</b></p> <p>(22) Дата подання заявки: <b>07.05.2020</b></p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: <b>13.10.2020</b></p> <p>(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: <b>12.10.2020, Бюл.№ 19</b></p>	<p>(72) Винахідник(и): <b>Храменко Наталя Іванівна (UA), Гайдамака Тетяна Борисівна (UA), Дрожжина Галина Іванівна (UA), Величко Людмила Миколаївна (UA), Богданова Олександра Вікторівна (UA)</b></p> <p>(73) Володілець (володільці): <b>ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ОЧНИХ ХВОРОБ І ТКАНИННОЇ ТЕРАПІЇ ІМ. В.П. ФІЛАТОВА АМНУ", б-р Французький, 49/51, м. Одеса, 65026 (UA)</b></p>
---	---

**(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ РЕЦИДИВУ ПРИ ХРОНІЧНОМУ ПЕРЕБІГУ РЕЦИДИВУЮЧОГО СТРОМАЛЬНОГО ГЕРПЕТИЧНОГО КЕРАТИТУ**

**(57) Реферат:**

Спосіб діагностики рецидиву при хронічному перебігу рецидивуючого стромального герпетичного кератиту включає забір крові натщесерце, відокремлення лімфоцитарно-лейкоцитарної суміші клітин та тестування зміни функціональної активності Т-лімфоцитів периферичної крові. Забір 4-5 мл крові здійснюють з ліктьової вени, гепаринізують її, розчиняють 2 рази 0,9 % розчином NaCl, двічі центрифугують, за допомогою фікол-верографіну отримують осад-суспензію лімфоцитів, готують з нього мазок на предметному склі, фіксують, наносять на мазок моноклональні антитіла (CD-54), промивають, фарбують, підраховують під мікроскопом реагуючі клітини, обчислюють їх відносну кількість (%) на 100 вільних лімфоцитів. При підвищенні відносного показника (%) експресії ICAM-1 (CD 54) на лімфоцитах крові у хворих хронічним рецидивуючим стромальним герпетичним кератитом більше ніж на 16 % від вихідного в період ремісії, встановлюють наявність рецидиву.

**UA 144571 U**



Корисна модель належить до медицини, а саме до офтальмології, і може бути використана для визначення активації запалення (рецидиву) при хронічному перебігу рецидивуючого герпетичного кератиту.

В даний час при наявності арсеналу протизапальних і противірусних засобів ураження органу зору вірусом простого герпесу (ВПГ) є серйозною клінічною проблемою, оскільки рецидування є одним з характерних ознак офтальмогерпесу (ОГ). Кожен наступний рецидив, як правило, протікає важче, частіше призводить до ускладнень (вторинна глаукома, виразка рогівки, перфорація рогівки, запалення судинної оболонки і т.д.), частіше вимагає хірургічного лікування і може обумовлювати інвалідизацію пацієнта. У зв'язку з цим, чітке діагностування і їх запобігання є важливим завданням офтальмології.

Клінічні ознаки СГК включають набряк, непрозорість строми і неоваскуляризації рогівки, які викликаються повторюванням реактивації ВПГ і впровадженням його в рогівку. Потужна імунна відповідь на вірусні білки призводить до востаннє кровеносних судин, інфільтрації лейкоцитів і пошкодження строми рогівки і ендотелію, які в сукупності сприяють помутнінню рогівки та її набряку [Каспаров А. А. Офтальмогерпес / Каспаров А. А. - М.: Медицина, 1994. - 224 с.].

Важлива роль відводиться характеру запальної відповіді хазяїна-носія ВПГ, системи його імунного захисту. Імунопатогенез ОГ складний, різноманітний і з причини цього знання про нього неоднорідні і багато в чому суперечливі. Так, високі титри специфічних противірусних антитіл в сироватці крові, що свідчать про персистування ВПГ в організмі, повинні грати протективну роль в запобіганні реінфекції, але в той же час на тлі цих високих показників специфічного гуморального імунітету можливі часті рецидиви ОГ [Опportunistiche герпесвирусные инфекции в патогенезе воспалительных заболеваний глаз / Г. И. Кричевская, В. О. Анджелов, Л. А. Катаргина [и др.] // Актуальные вопросы воспалительных заболеваний глаз: научно-практическая конференция 20-21 ноября 2001 г.: Материалы конференции. - М., 2001. - С. 184-186].

Відомо, що досить високий рівень імунореактивності за показниками Т-клітинно-опосередкованого імунітету визначає можливість одужання при загостренні герпесу і забезпечує протигерпетичний імунітет в організмі в цілому.

У клінічному аспекті тяжкість і тривалість стромальної хвороби залежить, в основному, від кількості та локалізації герпетичного антигену в рогівці і від активності Т-клітинного імунітету. Найбільш часті клінічні форми герпетичної хвороби у глибоких шарах рогівки - дископодібний кератит, імунні кільця, розплавлення рогівки (некротичний СГК). Некротична форма СГК є найбільш важкою, вимагає негайного лікування з метою запобігання перфорації рогівки. СГК є імуномодульованим і виникає в результаті хронічної вірусної ре активації [Al-Dujaili L. J., Clerkin P. P., Clement C., McFerrin H. E., Bhattacharjee P. S., Varnell E. D., Kaufman H. E., Hill J. M. Ocular herpes simplex virus: how are latency, reactivation, recurrent disease and therapy interrelated/Fwft/re Microbiology. 2011; 6(8):877-907. doi: 10.2217/fmb. 11.73].

Характерна особливість герпетичного стромального кератиту - невідповідність між клінічним станом ока і результатами патоморфологічного дослідження диска тканини рогівки, в якому при відсутності клінічних ознак запалення патоморфологічними методами виявляються ознаки запалення. За даними різних авторів ця невідповідність виявляється в 1/3 клінічно неактивних помутнень рогівки.

Hillenaar T. та співавт. приводять свій досвід клінічної діагностики, коли при спостереженні за рогівкою 35 пацієнтів за допомогою щільної лампи стан запалення (рецидиву) було пропущено в 3 випадках, а при діагностиці за допомогою конфокальної мікроскопії - в 6 випадках [Hillenaar T, van Cleynenbreugel H, Verjans GM, Wubbels RJ, Remeijer L. Monitoring the inflammatory process in herpetic stromal keratitis: the role of in vivo confocal microscopy. Ophthalmology. 2012 Jun; 119(6): 1102-10. doi: 10.1016/j.ophtha. 2011.12.002. Epub 2012 Feb 22].

Невідповідність клінічної картини і патоморфологічних змін рогівки були відзначені і в нашій роботі: в стадії клінічної ремісії патоморфологічні запальні зміни тканини рогівки виявлено у 60,9 % хворих, при цьому у 17,4 % з них - абсолютна перевага запальних змін [Гайдамака Т. Б., Дрожжина Г. И., Храменко Н. И., Думброва Н. Е. Взаимосвязь клинико-функциональных проявлений и патоморфологических изменений роговицы у больных герпетическим кератитом. // Офтальм. журн. - 2011, - № 5. - с. 12-16].

Відомо, що СГК є запальним захворюванням з рецидивуючим перебігом за типом хронічного запалення. Цей тип запалення характеризується великою тривалістю і клінічно слабкою виразністю запальних симптомів. Цим можна пояснити те, що у деяких хворих СГК при відсутності клінічних ознак запалення патоморфологічно відзначаються запальні зміни рогівки.

Розроблений раніше нами спосіб етіологічної діагностики запальних захворювань очей шляхом визначення сенсibiliзації організму до бактеріальних і вірусних алергенів та антигенів

тканин ока на основі тестування зміни функціональної активності Т-лімфоцитів периферичної крові при додаванні вищеназваних антигенів дає можливість удосконалити етіологічну діагностику захворювань ока герпетичної етіології. Однак він не дає можливості уточнити процес активації запалення [Пат. 38724 А Україна, МПК 7 А61В 5/00. Спосіб етіологічної

5 діагностики запальних захворювань ока. Дегтяренко Т. В., Савко В. В., Коновалова Н. В., Наріцина Н. І., Гайдамака Т. Б.; заявник та патентовласник Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В. П. Філатова. - № 2000095187; заявл. 07. 09. 2000; опубл. 15. 05. 2001, Бюл. № 4. Кн. 2 - С. 1.]

Наступний розроблений нами спосіб [Патент України 37635 А] діагностики герпетичних кератитів забезпечує об'єктивну кількісну реєстрацію осередкової алергічної реакції на введення герпетичної вакцини у хворих герпетичними кератитами, що дозволяє проводити діагностику захворювання, оцінюючи при цьому зміну гемодинаміки ока у відповідь на введення специфічного антигену. При вираженому підвищенні кровонаповнення в оці після проведення внутрішньошкірної проби до герпетичної вакцини, ми відклали проведення протирецидивного лікування, так як високий рівень кровонаповнення ока хворого характеризує гострий запальний процес і є протипоказанням для введення герпетичної вакцини в зв'язку з можливим розвитком важкої осередкової алергічної реакції і рецидиву захворювання [Гайдамака Т. Б., Пономарчук В. С., Храменко Н. І. Спосіб діагностики герпетичного кератиту // Патент України 37635 А. - Бюл. № 4. - 2001 р.]

20 Діагностика герпетичної інфекції ока є дійсно складним завданням і має бути комплексною, включаючи аналіз: 1) анамнезу, 2) клінічної картини і 3) діагностичних тестів. Жодна зі складових не дає 100 % відповідь на поставлене запитання. Дані лабораторних досліджень залежать від багатьох факторів: часу і якості забору матеріалу, виду патологічного процесу, тривалості прийому противогерпетических препаратів.

25 Однак як виявлення ВПГ в тканинах ока і в крові, так і визначення стану специфічного протівірусного імунітету необхідно нам для постановки діагнозу, для вибору методів і доз медикаментозної терапії, а в деяких випадках для вирішення питання хірургічного лікування наших пацієнтів.

30 З огляду на недоліки наявних методів, розробка нових методів діагностики герпетичної інфекції є актуальним завданням. Подальшої розробки вимагають методи, що дозволяють діагностувати рецидиви офтальмогерпесу, які є основною проблемою цього захворювання. З огляду на те, що прояви запалення при рецидивуючому стромальному кератиті виражені не завжди клінічно чітко, потрібна додаткова діагностика для проведення обґрунтованого протизапального лікування.

35 Маркер ICAM-1 (CD-54) (маркер молекули міжклітинної адгезії) відомий своєю роллю в забезпеченні адгезії лейкоцитів до ендотеліальних клітин і проникнення лейкоцитів через стінку судин. В даний час він розцінюється як біомаркер запалення. ICAM-1 експресується на поверхні клітини і активується у відповідь на різні медіатори запалення, включаючи прозапальні цитокіни, гормони і вірусну інфекцію (Roebuck KA, Finnegan A Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. J Leukoc Biol. 1999 Dec; 66(6): 876-88.)

40 Нами були обстежені хворі з СГК і запропоновані показники кількості ICAM-1 (CD-54) для діагностики загострення хронічного запального процесу (рецидиву).

45 У нашій роботі ми обстежили 46 хворих на рецидивуючий СГК в латентний період (ремісія) і період загострення (рецидив). Часто рецидивуючий перебіг розцінювали як такий при частоті загострення кератиту більше 1 разу на рік. Вік хворих коливався від 20 до 60 років. Контрольну групу склали 27 здорових добровольців від 20 до 64 років. Досліджували молекулярні маркери активації лімфоцитів ICAM-1 (CD-54) за допомогою моноклональних антитіл кров імуноцітохімічним методом. Визначали абсолютний і відносний рівень експресії маркера міжклітинних молекул адгезії ICAM-1 (CD-54) на лімфоцитах крові.

50 Для опису розподілу використовували: медіану Me, квартили (нижній і верхній) - Q (1-и), середнє і відносне відхилення M (SD), довірчий інтервал 95 % - CI (95 %). Для визначення рівня значущості відмінностей між групами застосовували тест Mann-Whitney, t - критерій Стьюдента.

55 У осіб контрольної групи експресія ICAM-1 на лімфоцитах в периферичній крові за відносним показником ICAM-1 дорівнювала 8,5 (2,0)%. Розмах коливань показника при CI (95 %) - 7,7-9,3 %.

У пацієнтів з рецидивуючим СГК в період ремісії відносна кількість ICAM-1 не відрізнялася в залежності від частоти рецидивів на рік і в середньому дорівнювала 23,4±1,2 %, розмах коливань показника 20,9-25,8 %. CI (95 %). Ці показники вищі, ніж в контрольній групі в 2,8 разу (p = 0,000), що підтверджує уповільнений запальний процес.

При клінічній картині загострення рецидивуючого СГК незалежно від частоти розвитку запалення відносний показник експресії ICAM-1 на лімфоцитах дорівнював  $26,8 \pm 0,9$  %, варіював від 25,8 до 29,7 %. СІ (95 %). Ці показники вищі 3,3 разу, ніж в контрольній групі ( $p = 0,000$ ), а також вище на 16 % ( $p = 0,007$ ) ніж при ремісії СГК. Ці дослідження стали основою

5

пропонованого нами способу діагностики рецидиву при хронічному перебігу рецидивуючого стромального герпетичного кератиту.

В основу корисної моделі поставлена задача удосконалення способу етіологічної діагностики запальних захворювань ока шляхом визначення рівня відносної кількості маркера експресії молекули міжклітинної адгезії ICAM-1 (CD-54) на лімфоцитах крові, за рахунок чого

10

стає можливим при клінічно невиражених або слабо виражених ознаках запалення зареєструвати його активацію - визначити наявність рецидиву стромального герпетичного кератиту, що дозволить підвищити ефективність діагностики і своєчасно провести протизапальну і протівірусну терапію.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі діагностики рецидиву при хронічному перебігу рецидивуючого стромального герпетичного кератиту, який полягає у заборі крові натщесерце, відокремленні лімфоцитарно-лейкоцитарної суміші клітин та тестуванні змін функціональної активності Т-лімфоцитів периферичної крові, згідно з корисною моделлю забір 4-5 мл крові здійснюють з ліктьової вени, гепаринізують її, розчиняють 2 рази 0,9 % розчином NaCl, двічі центрифугують, за допомогою фікол-верографіну отримують осад-суспензію лімфоцитів, готують з нього мазок на предметному склі, фіксують, наносять на мазок моноклональні антитіла (CD-54), промивають, фарбують, підраховують під мікроскопом реагуючі клітини, обчислюють їх відносну кількість (%) на 100 вільних лімфоцитів, і, якщо підвищення відносного показника (%) експресії ICAM-1 (CD 54) на лімфоцитах крові у хворих рецидивуючим СГК більше, ніж на 16 % від вихідного в період ремісії, встановлюють наявність рецидиву.

15

20

25

Причинно-наслідкові зв'язки:

визначення рівня відносної кількості маркера експресії молекули міжклітинної адгезії ICAM-1 (CD-54) на лімфоцитах крові, за рахунок цього стає можливим при клінічно невиражених або слабо виражених ознаках запалення зареєструвати його активацію - визначити наявність рецидиву стромального герпетичного кератиту, що дозволить підвищити ефективність діагностики і своєчасно провести протизапальну і протівірусну терапію.

30

Спосіб здійснюється таким чином:

забір крові у пацієнта з СГК проводять з ліктьової вени одноразовою вакуумною системою. Далі 4-5 мл гепаринізованої венозної крові розводять 0,9 % розчином NaCl в 2 рази. Піпеткою акуратно нашаровувать розведену кров на 3-4 мл градієнта щільності фікол-верографіну ( $D=1,076-1,078$ ). Центрифугують протягом 40 хв., при 2 тис. об/хв., після чого обережно знімають білясте кільце мононуклеарів з градієнта щільності і кладуть в центрифужні пробірки, в які розводять їх 0,9 % розчином NaCl. Двічі відмивають (шляхом центрифугування) клітини, зливаючи надосадову рідину і ресуспендуючи осад в новій порції 0,9 % розчину NaCl: перше центрифугування - 10 хв., при 2 тис. об/хв. (400 G), друге - 5 хв., при 1,5 тис. об/хв. (200 G). Потім до осаду додають невелику кількість 0,9 % розчину NaCl, ретельно ресуспендують.

35

40

Мазки готують таким чином. На предметне скло наносять велику краплю (0,05 мл) суспензії виділених в градієнти щільності фікол-верографіну і відмитих лімфоцитарних клітин з концентрацією  $2-4 \cdot 10^9$  /л. Розміщують скло в холодильник і залишають при  $4^\circ\text{C}$  для осідання клітин в суворо горизонтальному положенні. Через 20 хв., скло виймають з холодильника, знімають надлишок рідини і швидко висушують шар клітин, що утворився, при кімнатній температурі під вентилятором. Препарати розміщують в посудину для фіксації мазків (фіксація в парах 10 % нейтрального формаліну), після чого занурюють в скляночку з відмиваючим розчином (ЗФР) до початку імуноцитохімічної реакції. Видаляють надлишок вологи навколо мазка за допомогою фільтрувального паперу.

45

50

Далі наносять 20-50 мкл первинних мкАТ певної специфічності так, щоб реагент був рівномірно розподілений по всій площі відміченої зони реакції. Інкують 1-2 години при кімнатній температурі. Обережно змивають первинні мкАТ шляхом занурення скла в скляночки з трьома змінами ЗФР на 10-15 хв. Видаляють надлишок відмиваючого розчину фільтрувальним папером. Наносять 20-50 мкл кролячої сироватки проти імуноглобуліну мишей (єднальна сироватка) в надлишковому титрі. Інкують 30 хв. Ретельно відмивають препарат шляхом занурення в ЗФР. Наносять в зону реакції 20-50 мкл ПАП комплексу. Інкують 1 годину, відмиваючи препарат.

55

Проводять цитохімічну реакцію визначення активності пероксидази: кладуть препарат в розчин 3,3-діамінобензидину-тетрахлориду на 15 хв., промивають дистильованою водою і

60

дофарбовують ядра 1 % розчином метилового зеленого. Мікроскопія при збільшенні об'єктиву - х80, окуляра -х15.

5 Клітини, які містять антиген, що виявляється (який зв'язався з пероксидазою хрину), мають по краю цитоплазми темний обідок коричневого кольору. Проводять підрахунок даних клітин під мікроскопом, обчислюють їх кількість на 100 лімфоцитів, визначають відносну кількість % таких клітин в крові. При підвищенні відносної кількості більше 16 % визначають активацію запалення – рецидив.

Хвора С., 59 років. Діагноз: рецидивуючий стромальний герпетичний кератит лівого ока. Хворіє 5 років, рецидиви частіше 1 разу на рік.

10 При обстеженні в період без клінічно виражених ознак - в ремісії, за даними імунограми відносна кількість лімфоцитів з експресією маркера ICAM-1 становила 22 %. При загостренні захворювання, що супроводжувалося погіршенням гостроти зору, помірною перикорнеальною ін'єкцією склери, ущільненням помутніння рогівки, кількість лімфоцитів з експресією маркера ICAM-1 становило 31 %, що дозволило діагностувати рецидив, та провести протизапальну і  
15 противірусну терапію, яка привела до поліпшення зорових функцій і клінічних ознак кератиту.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

20 Спосіб діагностики рецидиву при хронічному перебігу рецидивуючого стромального герпетичного кератиту, що включає забір крові натщесерце, відокремлення лімфоцитарно-лейкоцитарної суміші клітин та тестування зміни функціональної активності Т-лімфоцитів периферичної крові, який **відрізняється** тим, що забір 4-5 мл крові здійснюють з ліктьової вени, гепаринізують її, розчиняють 2 рази 0,9 % розчином NaCl, двічі центрифугують, за допомогою фікол-верографіну отримують осад-суспензію лімфоцитів, готують з нього мазок на  
25 предметному склі, фіксують, наносять на мазок моноклональні антитіла (CD-54), промивають, фарбують, підраховують під мікроскопом реагуючі клітини, обчислюють їх відносну кількість (%) на 100 вільних лімфоцитів, і, якщо підвищення відносного показника (%) експресії ICAM-1 (CD 54) на лімфоцитах крові у хворих хронічним рецидивуючим стромальним герпетичним кератитом більше ніж на 16 % від вихідного в період ремісії, встановлюють наявність рецидиву.  
30

---

Комп'ютерна верстка В. Юкін

---

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,  
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

---

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