



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/53 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2017109829, 24.03.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
24.03.2017Дата регистрации:
05.03.2018

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 24.03.2017

(45) Опубликовано: 05.03.2018 Бюл. № 7

Адрес для переписки:

125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10,
ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского
Роспотребнадзора, патентный отд.

(72) Автор(ы):

Топтыгина Анна Павловна (RU),
Семикина Елена Леонидовна (RU),
Петричук Светлана Валентиновна (RU),
Закиров Рустам Шакирович (RU),
Самохина Ирина Валериевна (RU),
Курбатова Ольга Владимировна (RU),
Копыльцова Елена Александровна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное Бюджетное учреждение науки
"Московский научно-исследовательский
институт эпидемиологии и микробиологии
им. Г.Н. Габричевского" Федеральной
службы по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека (RU),
Федеральное государственное автономное
учреждение "Национальный
научно-практический центр здоровья детей"
Министерства здравоохранения Российской
Федерации (ФГАУ "ННПЦЗД" Минздрава
России) (RU)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2111490 C1, 20.05.1998. RU
2089899 C1, 10.09.1997. RU 2535406 C1,
10.12.2014. UA 83664 C2, 11.08.2008. BY 18992
C1, 28.02.2015.

(54) Способ оценки состояния здоровья человека с помощью иммунологического исследования крови

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к иммунологии, и может быть использовано для оценки состояния здоровья человека. В периферической крови обследуемого с помощью метода проточной цитофлюорометрии определяют процентное содержание Th17-лимфоцитов, а именно процент лимфоцитов с фенотипом CD3⁺CD4⁺CD161⁺CD45R0⁺ от гейта CD3⁺CD4⁺лимфоцитов. Вычисляют расчетный показатель процентного содержания Th17-

лимфоцитов в периферической крови по следующей формуле: $y = -0,0059x^2 + 0,6819x + 1,1671$,

где x - возраст обследуемого лица в годах, y - расчетный процент Th17 для данного возраста; сравнивают расчетный и реальный показатели процентного содержания Th17-лимфоцитов в периферической крови. При их совпадении или наличии между ними разницы, не превышающей 2σ , обследуемого считают здоровым. В случае

превышения реального показателя Th17-лимфоцитов над расчетным более чем на 2σ обследуемого считают больным, где σ - стандартное отклонение. Использование данного способа позволяет на основании критерия соответствия возрастной норме индивидуального

уровня Th17-лимфоцитов в периферической крови выявить среди лиц с неизвестным анамнезом и неясными клиническими проявлениями группу здоровых лиц и группу больных лиц. 1 пр., 1 табл., 1 ил.

R U 2 6 4 6 5 0 3 C 1

R U 2 6 4 6 5 0 3 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
G01N 33/53 (2006.01)

(21)(22) Application: **2017109829, 24.03.2017**

(24) Effective date for property rights:
24.03.2017

Registration date:
05.03.2018

Priority:

(22) Date of filing: **24.03.2017**

(45) Date of publication: **05.03.2018** Bull. № 7

Mail address:

**125212, Moskva, ul. Admirala Makarova, 10, FBUN
MNIEM im. G.N. Gabrichevskogo
Rospotrebnadzora, patentnyj otd.**

(72) Inventor(s):

**Toptygina Anna Pavlovna (RU),
Semikina Elena Leonidovna (RU),
Petrichuk Svetlana Valentinovna (RU),
Zakirov Rustam Shakirovich (RU),
Samokhina Irina Valerievna (RU),
Kurbatova Olga Vladimirovna (RU),
Kopyltsova Elena Aleksandrovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe Byudzhethnoe uchrezhdenie nauki
"Moskovskij nauchno-issledovatel'skij institut
epidemiologii i mikrobiologii im. G.N.
Gabrichevskogo" Federalnoj sluzhby po nadzoru
v sfere zashchity prav potrebitel'j i
blagopoluchiya cheloveka (RU),
Federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe
uchrezhdenie "Natsionalnyj
nauchno-prakticheskij tsentr zdorovya detej"
Ministerstva zdravookhraneniya Rossijskoj
Federatsii (FGAU "NNPTSZD" Minzdrava
Rossii) (RU)**

(54) **METHOD FOR EVALUATING HUMAN HEALTH CONDITION WITH IMMUNOLOGICAL BLOOD ANALYSIS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to medicine, specifically to immunology, and can be used for estimating human health condition. In the peripheral blood of the subject, using the flow cytometry method, the percentage of Th17 lymphocytes is determined, namely the percentage of lymphocytes with the phenotype $CD3^+CD4^+CD161^+CD45R0^+$ from the gate of $CD3^+CD4^+$ lymphocytes. Estimated percentage of Th17 lymphocytes in peripheral blood is calculated according to the following formula: $y = -0.0059x^2 + 0.6819x + 1.1671$, where x is the age of the subject in years, y is the calculated percentage of Th17 for a given

age; the calculated and real values of the percentage of Th17 lymphocytes in the peripheral blood are compared. If they coincide or if the difference between them does not exceed 2σ , the subject is considered healthy. If the actual Th17-lymphocyte count exceeds the calculated value by more than 2σ the patient is considered ill, where σ – standard deviation.

EFFECT: use of this method allows to identify a group of healthy individuals and a group of sick persons on the basis of the criterion of the correspondence of the age-specific norm of Th17-lymphocytes in peripheral blood to those with unknown anamnesis and unclear clinical manifestations.

1 cl, 1 ex, 1 dwg, 1 tbl

Изобретение относится к области медицинской иммунологии, а именно к иммунологическим способам оценки состояния здоровья человека.

Изобретение может быть использовано в медицине для подтверждения состояния здоровья человека. В преамбуле к Уставу Всемирной организации здравоохранения говорится, что здоровье является состоянием полного физического, душевного и социального благополучия, а не только отсутствием болезней и физических дефектов. Тем не менее, в медико-санитарной статистике под здоровьем на индивидуальном уровне понимается отсутствие выявленных расстройств и заболеваний. На сегодняшний момент нет стандартного метода, позволяющего четко разграничить состояние здоровья и болезни. Для оценки состояния здоровья обычно используют сбор анамнеза, клинический осмотр врача, термометрию, измерение частоты пульса, артериального давления, результаты клинического анализа крови и общего анализа мочи. Также используют другие лабораторные и инструментальные методы обследования. Таким образом, подтверждение состояния здоровья достаточно трудоемкий и часто длительный процесс. Тем не менее, далеко не всегда можно быть уверенным, что были проведены все необходимые обследования человека и какое-то заболевание не было упущено.

Известно, что иммунная система вовлечена в патогенез практически любого заболевания. В процессе иммунного ответа на антигены из исходно однородной субпопуляции Т-хелперов ($CD4^+$ Т-лимфоцитов) формируется несколько субпопуляций. К настоящему моменту идентифицированы следующие субпопуляции Т-хелперов (Th): Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, фолликулярные Т-хелперы и регуляторные Т-клетки. Субпопуляция Th17-лимфоцитов (Th17) регулирует противобактериальный и противогрибковый иммунный ответ и активирует нейтрофилы, но может поддерживать аутоиммунные заболевания [1]. Главным транскрипционным фактором для субпопуляции Th17 человека является RORC2, а основными цитокинами являются провоспалительные интерлейкины (IL): IL-17A, IL-21 и IL-22 [2]. Одной из важных поверхностных молекул, характерных для Th17, является CD161, а также хемокиновый рецептор CCR6 [3]. В процессе постнатального развития происходят длительные процессы формирования многих звеньев иммунной системы, в том числе субпопуляции Th17. Нам не удалось найти исследования, прослеживающего изменения уровня Th17 от рождения и до очень пожилого возраста. Однако если проанализировать уровень Th17 в контрольных группах в многочисленных исследованиях субпопуляции Th17 при различных заболеваниях у людей разного возраста [4, 5, 6, 7], то можно отметить, что у здоровых детей грудного и младшего возраста Th17 определяются на уровне 1-3% [4, 5], и их количество прогрессивно нарастает с возрастом [7]. Дополнительные изменения вносят различные заболевания.

При патологии различного генеза отмечается повышение уровня Th17 [1, 4, 5, 6]. Уровень Th17 в периферической крови повышается при различных аутоиммунных заболеваниях [8]; инфекциях [9]; аллергических [10] и онкологических заболеваниях [11]. Динамику уровня Th17 в ответ на введение вирусных антигенов удалось проследить на примере прививки живой вирусной вакциной против кори, краснухи и эпидемического паротита. Оказалось, что после введения вакцины быстро повышается количество активированных Th и Th17 в периферической крови. По завершении ответа на вакцину уровень Th17 снижается, но остается чуть выше исходного. Это превышение было не значимым, однако такая тенденция наблюдалась [12]. По-видимому, специфические Th17-лимфоциты образуются при каждом иммунном ответе, и после его завершения какая-то небольшая часть образовавшихся в данном иммунном ответе Th17 превращается в Th17 памяти и сохраняется в организме, чем и объясняется постепенный

прирост субпопуляции Th17 с возрастом. Таким образом, можно заключить, что при заболеваниях различного генеза происходит формирование Th17, уровень этих клеток в периферической крови повышается. Этот феномен может быть использован для разделения состояния здоровья и болезни.

5 Нам не удалось найти прямых аналогов заявленного изобретения. Наиболее близкое техническое решение описано в статье Н.Е. Галича [13], однако прогнозирование состояния здоровья или болезни основано не на анализе каких-либо субпопуляций лимфоцитов с помощью проточной цитофлуорометрии, а на анализе различных параметров файлов цитофлуорометрического анализа (анализ числа вспышек, распределение по каналам интенсивности флуоресценции и т.п.). Эти параметры зависят от тех настроек, которые использует оператор при конкретном измерении, поэтому предложенный способ оценки здоровья весьма приблизителен и может давать существенные ошибки в диагностике. Также были предложены способы оценки состояния здоровья с помощью комплексной оценки, в состав которой входили 10 некоторые иммунологические параметры [14, 15]. В первом патенте учитывали такой параметр, как малоновый альдегид и отношение Th к Т-супрессорам, а во втором - уровень общих сывороточных IgA, IgG, IgE, но ни в том, ни в другом патенте не использовали такой параметр, как Th17, что неудивительно, поскольку в 2001 году, когда были поданы оба патента, еще не знали о существовании Th17.

20 Задачей изобретения является разработка способа оценки состояния здоровья человека с помощью иммунологического исследования крови, позволяющего подтвердить состояние здоровья на основании соответствия индивидуального уровня Th17-лимфоцитов возрастным нормам.

Технический результат заключается в разработке способа оценки состояния здоровья человека, позволяющего четко различать состояние здоровья и болезни на основании 25 критерия соответствия возрастной норме индивидуального уровня Th17-лимфоцитов в периферической крови. Такие знания позволяют выявить среди лиц с неизвестным анамнезом и неясными клиническими проявлениями группу здоровых лиц и группу больных. Разработанный способ оценки состояния здоровья помогает осуществлять контроль за состоянием здоровья групп граждан и осуществлять первичный отбор 30 группы больных, требующих дальнейшего исследования причин их заболевания, и группы здоровых, не требующих дальнейшего исследования.

Поставленная задача достигается путем разработки способа оценки состояния здоровья на основании соответствия индивидуального уровня Th17-лимфоцитов в 35 периферической крови конкретного человека, определенного с помощью проточной цитофлуорометрии, его возрастной норме, рассчитанной по предложенной формуле.

Сущность изобретения заключается в следующем.

Для установления динамики возрастных норм уровня Th17-лимфоцитов в периферической крови было обследовано 352 здоровых человека (168 лиц женского 40 пола и 184 - мужского), в возрасте от 1 месяца до 85 лет, в том числе младше 1 года - 79, в возрасте 1-2 года 11 мес. - 34, 3-4 года 11 мес. - 24, 5-6 лет 11 мес. - 28, 7-8 лет 11 мес. - 25, 9-11 лет 11 мес. - 36, 12-14 лет 11 мес. - 39, 15-18 лет - 26, 20-35 лет - 25, 36-49 лет - 11, 50-70 лет - 16 и в возрасте более 70 лет - 9 человек. Состояние здоровья оценивали при проведении профилактических осмотров и ежегодной диспансеризации, по результатам которых подтверждено отсутствие острых и хронических заболеваний 45 у всех обследованных. Полученные в результате лабораторного обследования показатели клинического анализа крови находились в пределах возрастных норм.

Иммунофенотипирование лимфоцитов крови проводили методом проточной

цитофлюорометрии с четырехцветным окрашиванием в реакции прямой иммунофлюоресценции по технологии окрашивания лимфоцитов в цельной крови с последующим лизированием эритроцитов (технология и реактивы BD Biosciences (США) - проточный цитометр FACSCalibur, программа сбора и обработки информации CellQuest). Выделение лимфоидного региона проводилось по показателям прямого и бокового светорассеяния с учетом экспрессии CD45. Определяли уровень Th17-лимфоцитов с фенотипом $CD3^+CD4^+CD161^+CD45R0^+$, для этой популяций оценивался процент в составе всех Th-клеток (в гейте $CD3^+CD4^+$). Возрастная динамика процента Th17-лимфоцитов в периферической крови здоровых людей в гейте $CD3^+CD4^+$ лимфоцитов ($M \pm SE$) представлены на Фиг. 1. Пунктирной линией обозначен график аппроксимации.

Анализ уровня Th17-лимфоцитов выявил сильную положительную корреляцию между возрастом и уровнем лимфоцитов этой субпопуляции в периферической крови здоровых лиц, коэффициент корреляции Пирсона составил 0,82. В результате проведенного математического анализа было установлено, что выявленная зависимость аппроксимируется квадратным уравнением: $y = -0,0059x^2 + 0,6819x + 1,1671$, где x - возраст обследуемого лица в годах, а y - расчетный процент Th17 для данного возраста.

Величина достоверности аппроксимации R^2 составила 0,98, что говорит об очень высокой степени соответствия модели.

Для оценки состояния здоровья обследуемого следует рассчитать по формуле, полученной в результате аппроксимации наших данных ($y = -0,0059x^2 + 0,6819x + 1,1671$, где x - возраст обследуемого лица в годах), его возрастную норму процента Th17-лимфоцитов и далее с помощью проточной цитофлюорометрии определить процент Th17 (лимфоциты с фенотипом $CD3^+CD4^+CD161^+CD45R0^+$, процент от гейта $CD3^+CD4^+$ лимфоцитов) у данного человека в периферической крови. Если расчетный и реальный показатель совпадут или будут близки, то человека можно считать здоровым, если реальный уровень Th17-лимфоцитов превышает расчетный более чем на 5% (2σ) для детей до 3 лет, 7% (2σ) для детей от 3 до 7 лет и 10% (2σ) для людей старше 7 лет, то человек, вероятно, болен, и нужно искать причину его заболевания.

Пример

В качестве примера в Таблице 1 приведено процентное содержание Th17-лимфоцитов в периферической крови людей с неизвестным анамнезом.

Таблица 1. Реальный и расчетный уровень Th17 в процентах от гейта CD3⁺CD4⁺ лимфоцитов в периферической крови людей с неизвестным анамнезом.

Номер пациен- та	Возраст (в годах)	Th17 (%) реальный	Th17 (%) расчетный	Th17 (%) рас- четный + 2σ
1	48	20,8	20,3	30,3
2	6,2	13,1	5,2	12,2
3	11,5	20,2	8,2	18,2
4	15,6	29,2	10,4	20,4
5	76,1	30,4	18,9	28,9
6	55,4	19,9	20,8	30,8
7	18,3	11,5	11,7	21,7
8	17,75	16,6	11,4	21,4
9	1,8	2,6	2,4	7,4
10	34,3	25,5	17,6	27,6

Далее по формуле, полученной в результате аппроксимации наших данных ($y = -0,0059x^2 + 0,6819x + 1,1671$, где x - возраст обследуемого лица в годах), для каждого обследованного лица с неизвестным анамнезом были рассчитаны их возрастные нормы уровня Th17 (%) - столбец 4 в Таблице 1, и сопоставлены, используя критерий 2σ (столбец 5 в Таблице 1), с реальным уровнем Th17 (%) - столбец 3 в Таблице 1. В результате сопоставлений выяснилось, что у обследованных №1, 6, 7, 8, 9 и 10 их реальный уровень Th17 (%) соответствует возрастной норме, следовательно, эти люди должны быть расценены как здоровые, что соответствовало действительности. С другой стороны, у №2, 3, 4, 5 реальный уровень Th17 (%) превышает расчетный более чем на 2σ, следовательно, эти люди должны быть расценены как больные, что соответствовало реальности. Интересно подробнее рассмотреть обследуемых людей №8 и 10. Так, обследуемый №8 и по пороговому критерию, и по критерию соответствия возрастной норме должен быть отнесен к группе здоровых людей. Однако из анамнеза стало известно, что у данного человека диагноз ювенильный ревматоидный артрит, но этот пациент находится на биологической терапии (мабтера) и по всем показателям демонстрирует стойкую клинико-лабораторную ремиссию. Его реальный уровень Th17 (%) немного выше расчетного возрастного уровня, но не выходит за 2σ. Пациент под №10 имеет диагноз гломерулонефрит и также получает биологическую терапию. Реальный уровень Th17 (%) превышает уровень возрастной нормы, однако не выходит за пределы 2σ.

Таким образом, используя критерий соответствия реального уровня Th17 (%) расчетной возрастной норме, удалось правильно разделить здоровых лиц (№1, 6, 7, 9) и больных (№2, 3, 4, 5), а также выявить пациентов в ремиссии на биологической терапии (№8 и 10), для этого, правда, были нужны данные анамнеза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Korn T., Bettelli E., Oukka M., and Kuchroo V.K. IL-17 and Th17 Cells *Annu. Rev. Immunol.*, 2009, vol. 27, pp. 485-517.

2. Unutmaz D. RORC2: the master of human Th17 cell programming. *Eur. J. Immunol.*, 2009, vol. 39, no. 6, pp. 1452-1455.

5 3. Cosmi L., Palma R., Santarlasci V., Maggi L., Capone M., Frosali F., Rodolico G., Querci V., Abbate G., Angeli R., Berrino L., Fambrini M., Caproni M., Tonelli F., Lazzeri E., Parronchi P., Liotta F., Maggi E., Romagnani S., Annunziato F. Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor *J. Exp. Med.*, 2008, vol. 205, no. 8, pp. 1903-1916.

10 4. Li Y.Y., Wei S.G., Zhao X., Jia Y.Z., Zhang Y.F., Sun S.Z. Th17/Treg cell expression in children with primary nephritic syndrome and the effects of ox-LDL on Th17/Treg cells. *Genet. Mol. Res.* 2016, 15(2), pp. 1-8.

5 5. Dong H., Qu S., Chen X., Zhu H., Tai X., Pan J. Changes in the cytokine expression of peripheral Treg and Th17 cells in children with rotavirus enteritis. *Exp. Ther. Med.* 2015, Vol. 10 no 2, pp. 679-682.

6. Li Q., Wang Y., Wang Y., Chen K., Zhou Q., Wei W., Wang Y. Treg/Th17 ratio acts as a novel indicator for acute coronary syndrome. *Cell Biochem. Biophys.* 2014, Vol. 70, no 2, pp. 1489-1498.

20 7. Schmitt V., Rink L., Uciechowski P. The Th17/Treg balance is disturbed during aging. *Exp. Gerontol.* 2013, Vol. 48, no 12, pp. 1379-86.

8. Qu N., Xu M., Mizoguchi I., Furusawa J., Kaneko K., Watanabe K., Mizuguchi J., Itoh M., Kawakami Y., Yoshimoto T. Pivotal Roles of T-Helper 17-Related Cytokines, IL-17, IL-22, and IL-23, in Inflammatory Diseases *Clin Dev Immunol.* 2013; 2013: 968549.

25 9. Hemdan N.Y.A., Abu Ell-Saad A.M., Sack U. The Role of T Helper (T_H)17 Cells as a Double-Edged Sword in the Interplay of Infection and Autoimmunity with a Focus on Xenobiotic-Induced Immunomodulation. *Clin Dev Immunol.* 2013; 2013: 374769.

10. Ota K., Kawaguchi M., Matsukura S., Kurokawa M., Kokubu F., Fujita J., Morishima Y., Huang S., Ishii Y., Satoh H., Hizawa N. Potential Involvement of IL-17F in Asthma. *J. Immunol. Res.* 2014; 2014: 602846.

30 11. Alizadeh D., Katsanis E., Larmonier N. The Multifaceted Role of Th17 Lymphocytes and Their Associated Cytokines in Cancer. *Clin Dev Immunol.* 2013; 2013: 957878.

12. Топтыгина А.П., Семикина Е.Л., Алешкин В.А. Регуляция иммунного ответа у детей, привитых против кори, краснухи и эпидемического паротита // Иммунология - 2012. - Т. 33, №4. - С. 175-179.

35 13. Галич Н.Е. Иммунофлюоресценция и цитометрия в диагностике состояния здоровья: информационные энтропии, корреляции, бистабильности, вейвлеты // Здоровье - основа человеческого потенциала: проблема и пути их решения. - 2008. - Т. 3, №1. - С. 76-79.

40 14. Патент 2181888 Российской Федерации МПК 7G01N33/50А. Способ медико-социологической оценки здоровья населения трудоспособного возраста. / Решетников А.В.; заявитель и патентообладатель Решетников А.В. (RU). - №2001119204/14; заявл. 12.07.2001; опубл. 27.04.2002 Бюл. 12 - 8 с.: с ил.

45 15. Патент 2193353 Российской Федерации МПК 7G01N33/50В. Способ медико-социологической оценки здоровья населения нетрудоспособного возраста. / Решетников А.В.; заявитель и патентообладатель Решетников А.В. (RU). - №2001127295/14; заявл. 10.10.2001; опубл. 27.11.2002 Бюл. 33 - 8 с.: с ил.

(57) Формула изобретения

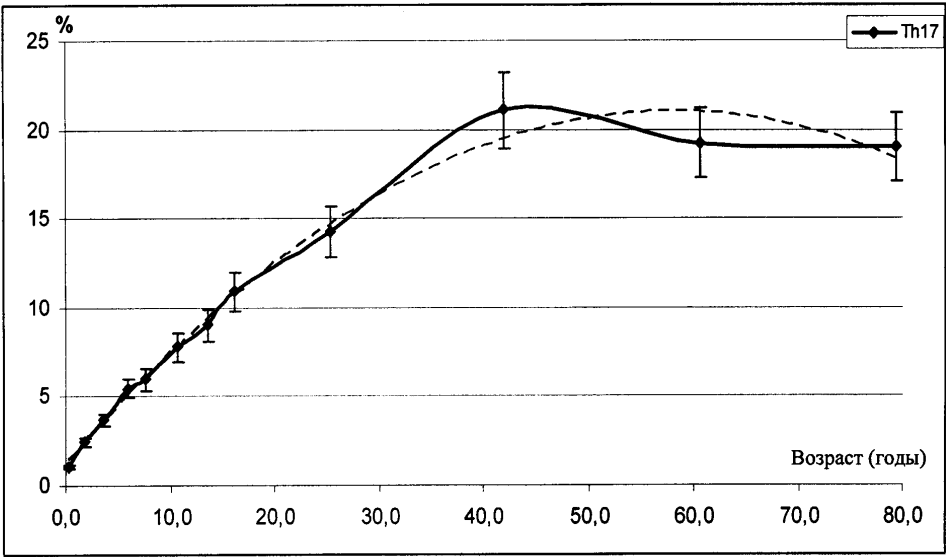
Способ оценки состояния здоровья человека с помощью иммунологического исследования крови, отличающийся тем, что в периферической крови обследуемого с помощью метода проточной цитофлюорометрии определяют процентное содержание Th17-лимфоцитов, а именно процент лимфоцитов с фенотипом $CD3^{+}CD4^{+}CD161^{+}CD45R0^{+}$ от гейта $CD3^{+}CD4^{+}$ лимфоцитов, вычисляют расчетный показатель процентного содержания Th17-лимфоцитов в периферической крови по следующей формуле:

$$y = -0,0059x^2 + 0,6819x + 1,1671,$$

где x - возраст обследуемого лица в годах,

y - расчетный процент Th17 для данного возраста,

сравнивают расчетный и реальный показатели процентного содержания Th17-лимфоцитов в периферической крови и при их совпадении или наличии между ними разницы, не превышающей 2σ , обследуемого считают здоровым, а в случае превышения реального показателя Th17-лимфоцитов над расчетным более чем на 2σ обследуемого считают больным, где σ - стандартное отклонение.



Фигура 1.