



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **99452** (13) **U**
(51) МПК
G01N 33/68 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2014 12078</p> <p>(22) Дата подання заявки: 10.11.2014</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.06.2015</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.06.2015, Бюл.№ 11</p>	<p>(72) Винахідник(и): Дужий Ігор Дмитрович (UA), Голубничий Станіслав Олександрович (UA), Голубнича Вікторія Миколаївна (UA), Піддубна Галина Павлівна (UA)</p> <p>(73) Власник(и): СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Римського-Корсакова, 2, м. Суми, 40007 (UA)</p>
--	---

(54) СПОСІБ НЕІНВАЗІЙНОЇ СКРИНІНГОВОЇ ЕТІОПАТОГЕНЕТИЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ СИНДРОМУ СПОНТАННОГО ПНЕВМОТОРАКСУ

(57) Реферат:

Спосіб неінвазивної скринінгової етіопатогенетичної діагностики синдрому спонтанного пневмотораксу включає лабораторне дослідження сироватки крові, при якому визначають рівень лейкоцитарної еластази. Додатково обчислюють індекс ядерного зсуву і, залежно від рівня показників лейкоцитарної еластази та індексу ядерного зсуву, визначають етіологію синдрому спонтанного пневмотораксу.

UA 99452 U

Корисна модель належить до медицини, а саме до торакальної хірургії, фтизіатрії, імунології, лабораторної діагностики, і може бути використана у клінічній практиці для неінвазійного скринінгового диференціювання різних за етіологією форм спонтанного пневмотораксу.

5 Незважаючи на активне вивчення, синдром спонтанного пневмотораксу (ССП) залишається однією з проблем сучасної торакальної хірургії. У зв'язку із значною кількістю причин розвитку ССП диференційна діагностика процесу ускладнюється, особливо на ранніх етапах.

Підвищення ефективності етіопатогенетичної диференціальної діагностики ССП є дуже актуальною проблемою.

10 На сьогодні основою етіологічної діагностики ССП є торакоскопія та гістологічні методи, які дозволяють із високою вірогідністю підтвердити причинний діагноз при туберкульозі, пухлинах та дифузних захворюваннях легень при якісному заборі біопсійного матеріалу із ураженої ділянки легень (Гетьман В.Г. Клінічна торакоскопія. - К.: Здоров'я, 1995. - 208 с.; Дужий І.Д. Труднощі діагностики хвороб плеври / Дужий І.Д. - Суми: Мрія-1, 2008. - 560 с. - (Першотвір)).

15 Оскільки зазначені методи є інвазійними і вимагають наявності вузьких спеціалістів та спеціального обладнання, яке існує лише у великих спеціалізованих лікарнях, це обмежує їх застосування взагалі, а у районних та дільничних лікарнях зокрема.

Відомо, що у 72-92 % хворих зі ССП морфологічним ґрунтом захворювання є дегенеративно-дистрофічні зміни у легеневій паренхімі, які супроводжуються її бульозною трансформацією. Причиною таких дегенеративно-дистрофічних змін вважають виражену адгезію нейтрофілів до ендотелію судин малого кола кровообігу та інфільтрацію ними паренхіми легень, що супроводжується вивільненням ними ферментів, особливо еластази, що призводить до пошкодження еластинової субальвеолярної вистілки і розвитку пухирчастих кортикальних утворів (Панасюкова О.Р., Кадан Л.П. Роль медіаторів запалення у патогенезі ХОЗЛ (огляд літератури) [FTP архів]. URL <ftp://ftp1.ifp.kiev.ua/original/2009/panasiukova2009.pdf>). На підставі власних досліджень операційного матеріалу хворих з бульозною емфіземою легень нами також виявлена виражена параваскулярна нейтрофільна інфільтрація паренхіми легень. Такі зміни були найбільш вираженими у ділянці бульозних утворів. Якщо у цих зонах трапляється вихід у навколишньосудинний простір ферментів, у т.ч. й еластази, теоретично може мати місце ухилення еластази й у судинне русло.

У зв'язку з цим не викликає сумніву необхідність пошуку діагностичних маркерів, які дозволять проводити неінвазійну етіопатогенетичну діагностику ССП.

Відомий спосіб діагностики дисплазії сполучної тканини хворих на туберкульоз, який здійснюють шляхом визначення рівня еластази в сироватці крові, порівнюють його з показником у хворих без ознак дисплазії сполучної тканини і при його значенні в 2-5 разів більше діагностують дисплазію сполучної тканини (С.Б. Павлов, Л.А. Суханова, Г.Б. Павлова / патент UA № 65072, М. кл. G01N 33/48, 25.11.2011).

Відомий спосіб визначення гіпереластаземії, при якому сироватку крові наносять на кварцову підкладку, сушать та витримують на відкритому повітрі 3,5-4 години, потім досліджують у прохідному світлі і при наявності в препараті агрегацій з прямокутних і призматичних кристалів визначають гіпереластаземію (Л.В. Савіна, О.В. Кокуєва, М.С. Яковенко, Л.П. Готовцева, В.Ю. Самсигін / патент RU № 2195660, М. кл. G01N 33/49, 27.12.2002).

Проте цей спосіб не дає числового значення рівня гіпереластаземії, а визначає тільки її наявність. Також тривалий час, потрібний на проведення дослідження, значно обмежує його використання у хворих з невідкладними станами, яким є ССП.

Найближчим аналогом-прототипом щодо пошуку еластази у судинному руслі є спосіб, що включає біохімічне дослідження лейкоцитарної еластази у сироватці крові хворих на туберкульоз (А.И. Макинський, А.Я. Спирина, В.Л. Доценко, Е.А. Нешкова / патент RU № 2161313, М. кл. G01N 33/68 27.12.2000). Проте автори даний спосіб застосовували для визначення активності туберкульозного легеневого запалення, а ми поставили за мету діагностувати цим неінвазійним методом причину ССП.

В основу запропонованої нами корисної моделі поставлено задачу створення способу неінвазійної скринінгової етіопатогенетичної діагностики ССП, у якому шляхом визначення у периферійній крові індексу ядерного зсуву (ІЯЗ) і рівня лейкоцитарної еластази та їх взаємовідношення вдається встановити етіологію ССП, навіть на рівні районних та селищних лікарень, що дозволяє провести попереднє "сортування" хворих із подальшим їх цілеспрямованим направленням на стаціонарне лікування.

Поставлена задача вирішується тим, що у відомому способі, що включає лабораторне дослідження сироватки крові, при якому визначають активність лейкоцитарної еластази, згідно

із корисною моделлю, додатково обчислюють ІЯЗ, і залежно від рівня показників активності лейкоцитарної еластази та ІЯЗ, визначають етіологію спонтанного пневмотораксу. Так, за низьких показників ІЯЗ і низькому рівні лейкоцитарної еластази верифікують небульозну етіологію ССП, за високих показників ІЯЗ і високому рівні лейкоцитарної еластази верифікують 5
бульозну етіологію ССП, а за високих показників ІЯЗ і низькому рівні лейкоцитарної еластази верифікують метатуберкульозну етіологію ССП. Окрім цього, при небульозній етіології ССП показники ІЯЗ та рівня лейкоцитарної еластази знаходяться на рівні $0,08 \pm 0,014$ та 111 ± 13 нмоль/хв. мл. відповідно; при бульозній етіології ССП - $0,1 \pm 0,018$ та $182,4 \pm 14,8$ нмоль/хв. відповідно; при метатуберкульозній етіології ССП - на рівні $0,13 \pm 0,036$ та $107,3 \pm 16,4$ нмоль/хв. 10
мл. відповідно.

Спосіб здійснюється таким чином. У крові хворого визначають кількість мієлоцитів (М), юних (Ю), паличкоядерних (П) та сегментоядерних (С) нейтрофілів за загальноприйнятою методикою, потім обчислюють ІЯЗ за формулою $ІЯЗ = (М + Ю + П) : С$. У здорових людей ІЯЗ становив менше 0,05.

Активність лейкоцитарної еластази визначали спектрофотометричним методом із використанням як субстрату р-нітрофенілового ефіру бутилтриокси-аланіну (Meyer K.C, Lewandovski J.R., Zimmerman J., Nunley D., Calcoun W., Dopico G.A. Human neutrophil elastase complex in cystic fibrosis. // Am. Rev. Resp. Dis. - 1991. - V. 144. - P. 580-585). З цією метою у пробірку, відбирали 5 мл крові з ліктьової вени. Пробірку центрифугували при 1500 об/хв. 20
протягом 20 хвилин для отримання сироватки. Активність еластази визначали таким чином: у термостатовану кювету ($t = 30^\circ C$) наливали 2,8 мл трис - HCl буфера, 0,15 мл 1,18 % розчину ВОС (9,3 мг Nt - ВОС - L-Alanine p - nitrophenyl ester розводили у 1 мл ацетонітрилу) і 0,05 мл досліджуваної сироватки, розведеної 1:30. Інгредієнти змішували і визначали зміну оптичної щільності проби щохвилини протягом 4 хвилин на однопроменевому спектрофотометрі при довжині хвилі 347,5 нм. Аналогічно визначали оптичну щільність контрольної проби, де замість сироватки хворого брали 0,05 мл фізіологічного розчину. З лінійного ходу реакції вимірювали приріст щільності відносно контрольної проби. 25

Вибирали максимальний приріст серед 4 вимірювань і проводили розрахунок рівня лейкоцитарної еластази за формулою:

$$\frac{\Delta \times 0,652 \times 30}{1 \times 0,05},$$

де Δ максимальний приріст оптичної щільності зразка за 1 хвилину; 0,652 - емпірично виведена константа; 30 - ступінь розведення досліджуваної сироватки; 1 - час, за який вимірюють приріст оптичної щільності, у хвилинах; 0,05 - кількість досліджуваної сироватки в 30
мл.

Активність лейкоцитарної еластази вимірювали у нмоль/хв. мл. У здорових людей середній рівень лейкоцитарної еластази дорівнював 75 нмоль/хв. мл.

За даними отриманими від хворих були обраховані середні значення показників (М) та їх похибка (m). Межі коливання показників обчислювались згідно закону нормального розподілу випадкових величин із вірогідністю 95 % ($p \leq 0,05$). Так, у групі хворих із неспецифічним ССП небульозної етіології середнє значення ІЯЗ було $0,08 \pm 0,014$, а рівень еластази - 111 ± 13 нмоль/хв. мл. Межі коливання показника у цій групі хворих для ІЯЗ склали від 0,066 до 0,094; для еластази - від 98 до 124 нмоль/хв. мл. При ССП на тлі бульозної емфіземи легень середнє значення ІЯЗ становило $0,1 \pm 0,018$, а рівень лейкоцитарної еластази - $182,4 \pm 14,8$ нмоль/хв. мл. Межі коливання для ІЯЗ - від 0,082 до 0,118; для еластази - від 167,6 до 197,2 нмоль/хв. мл. При ССП метатуберкульозної етіології середнє значення ІЯЗ становило $0,13 \pm 0,036$, а рівень лейкоцитарної еластази - $107,3 \pm 16,4$ нмоль/хв. мл. Межі коливання для ІЯЗ склали від 0,094 до 0,166; для еластази - від 90,9 до 123,7 нмоль/хв. мл. 45

Таким чином, отримані дані дозволяють стверджувати, що ІЯЗ та лейкоцитарна еластаза є маркерами, які можуть бути використаними для диференційної діагностики різних етіопатогенетичних форм ССП, а саме: ІЯЗ при небульозній етіології ССП становив $0,08 \pm 0,014$, при бульозній - $0,1 \pm 0,018$, а при метатуберкульозній - $0,13 \pm 0,036$. Рівень лейкоцитарної еластази при небульозному ССП становив 111 ± 13 нмоль/хв. мл., при бульозній емфіземі - $182,4 \pm 14,8$ нмоль/хв. мл., при метатуберкульозному ССП - $107,3 \pm 16,4$ нмоль/хв. мл. Дана методика була імплементована при вивченні 21 хворого, що дало нам можливість неінвазивно 55
встановити етіологію ССП.

Наводимо конкретні приклади застосування способу.

Приклад 1. Хворий 3. 20 років, госпіталізований на лікування у торакальне відділення Сумської обласної клінічної лікарні з діагнозом Спонтанний пневмоторакс справа невідомої

етіології. Захворів раптово, коли з'явилися сухий кашель, біль та важкість у правій половині грудної клітки, прогресуюча задишка. Госпіталізований через 2 години від початку захворювання за направленням лікарів швидкої допомоги. При рентгенологічному дослідженні органів грудної клітки виявлено наявність повітря у правій плевральній порожнині, яке відтісняло легень на 1/2

5

об'єму легеневого поля, незначне зміщення середостіння вліво. У загальному аналізі крові визначили незначне підвищення загальної кількості лейкоцитів ($7 \times 10^9/\text{л}$) та паличкоядерний зсув управо (кількість паличкоядерних нейтрофілів - 6, сегментоядерних - 58), ІЯЗ - 0,103. При біохімічному дослідженні встановлено, що рівень лейкоцитарної еластази становив 173,9

10

нмоль/хв. мл. На підставі отриманих даних припущено наявність у хворого бульозної емфіземи легень неспецифічного ґенезу, що було підтверджено при відеоторакоскопічному обстеженні.

Приклад 2. Хворий Д. 21 рік, госпіталізований на лікування у торакальне відділення Сумської обласної клінічної лікарні з діагнозом "Спонтанний пневмоторакс справа". Захворів раптово, коли з'явилися сильний біль у правій половині грудної клітки, сухий кашель, задишка. З часом біль зник, турбувала лише задишка при фізичному навантаженні. Звернувся за медичною допомогою до районної лікарні через 4 доби від маніфестації захворювання, звідки був направлений до обласного центру. При рентгенологічному дослідженні справа пристінковий пневмоторакс на 1/4 об'єму легені, середостіння не зміщено. У загальному аналізі крові визначили незначне підвищення загальної кількості лейкоцитів ($7,5 \times 10^9/\text{л}$) та паличкоядерний зсув управо (кількість паличкоядерних нейтрофілів - 6, сегментоядерних - 65), ІЯЗ - 0,092. При біохімічному дослідженні встановлено, що рівень лейкоцитарної еластази становив 102,6

15

20

нмоль/хв. мл. На підставі цих даних припущено наявність у хворого ССП неспецифічної етіології без наявності бульозних змін легені. До обстеження застосована торакоскопія. У грудній порожнині були виявлені комбіновані злуки, відрив однієї з яких став причиною розвитку ССП.

Приклад 3. Хворий Т. 40 років, госпіталізований в ургентному порядку у Сумський обласний протитуберкульозний диспансер із діагнозом "Спонтанний пневмоторакс справа". Захворів гостро. З'явилися задишка та біль у правій половині грудної клітки. Протягом останнього місяця відчував нездужання, періодичний сухий кашель. Звернувся за медичною допомогою до районної лікарні, після обстеження скерований до Сумського обласного протитуберкульозного диспансеру. Госпіталізований через 1 добу після маніфестації процесу. При рентгенологічному дослідженні встановлено колабування правої легені до 1/4 об'єму, різке згущення легеневого малюнку правої легені, дисемінація в проекції верхньої долі лівої легені. У загальному аналізі крові визначили збільшення загальної кількості лейкоцитів ($10,3 \times 10^9/\text{л}$) та паличкоядерний зсув управо (кількість паличкоядерних нейтрофілів - 11, сегментоядерних - 60), ІЯЗ - 0,183. При біохімічному дослідженні встановлено рівень лейкоцитарної еластази 108,7 нмоль/хв. мл. Отже на підставі даних результатів можна було припустити наявність у хворого ССП метатуберкульозної етіології. Після обстеження із застосуванням торакоскопії виявлено субплевральні втягнуті рубці з деформацією кортикальних відділів легені. Встановлено дисемінований туберкульоз легень. Правосторонній пневмоторакс на тлі метатуберкульозних змін верхньої долі.

25

30

35

40

Таким чином запропонований спосіб неінвазивної скринінгової етіопатогенетичної діагностики спонтанного пневмотораксу є простим, дешевим та доступним для клінічної практики і рекомендований для широкого використання.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

45

1. Спосіб неінвазивної скринінгової етіопатогенетичної діагностики синдрому спонтанного пневмотораксу, що включає лабораторне дослідження сироватки крові, при якому визначають рівень лейкоцитарної еластази, який **відрізняється** тим, що додатково обчислюють індекс ядерного зсуву i , залежно від рівня показників лейкоцитарної еластази та індексу ядерного зсуву, визначають етіологію синдрому спонтанного пневмотораксу, так за низьких показників індексу ядерного зсуву і низькому рівні лейкоцитарної еластази верифікують небульозну етіологію синдрому спонтанного пневмотораксу, за високих показників індексу ядерного зсуву і високому рівні лейкоцитарної еластази верифікують бульозну етіологію синдрому спонтанного пневмотораксу, а за високих показників індексу ядерного зсуву і низькому рівні лейкоцитарної еластази верифікують метатуберкульозну етіологію синдрому спонтанного пневмотораксу.

50

55

2. Спосіб неінвазивної скринінгової етіопатогенетичної діагностики синдрому спонтанного пневмотораксу за п. 1, який **відрізняється** тим, що при небульозній етіології синдрому спонтанного пневмотораксу показники індексу ядерного зсуву та рівня лейкоцитарної еластази знаходяться на рівні $0,08 \pm 0,014$ та 111 ± 13 нмоль/хв. мл, відповідно; при бульозній етіології синдрому спонтанного пневмотораксу - $0,1 \pm 0,018$ та $182,4 \pm 14,8$ нмоль/хв. мл, відповідно; при

60

метатуберкульозній етіології синдрому спонтанного пневмотораксу - на рівні $0,13 \pm 0,036$ та $107,3 \pm 16,4$ нмоль/хв. мл, відповідно.

Комп'ютерна верстка М. Шамоніна

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