



УКРАЇНА

(19) UA (11) 43741 (13) U  
(51) МПК (2009)  
G01N 33/53МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ  
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

## (54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ ДИСБІОТИЧНИХ ПОРУШЕНЬ

1

(21) u200903834

(22) 21.04.2009

(24) 25.08.2009

(46) 25.08.2009, Бюл.№ 16, 2009 р.

(72) ЄГОРОВА СВІТЛАНА ЮРІЇВНА, КУДРЯВЦЕВА ВАЛЕНТИНА ЄВГЕНІЇВНА, ГАРКАВА КАТЕРИНА ГРИГОРІВНА, ТРОПКО ЛЮДМИЛА ВІТАЛІЇВНА, ЧЕЛКАН ВІРА ВОЛОДИМИРІВНА

(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ГАСТРОЕНТЕРОЛОГІЇ АМН УКРАЇНИ"

(57) Спосіб диференціації дисбіотичних порушень, який включає дослідження поглинальної активності нейтрофілних гранулоцитів в реакції фагоцитозу зі стандартною тест-культурою Escherichia coli, який відрізняється тим, що додатково проводять дослідження з виділеним у конкретного хворого штамом Escherichia coli, причому диференціацію

2

дисбіотичних порушень проводять за величиною коефіцієнта функціонального стану нейтрофілів (Кф), який визначають за формулою:  $Kf = \Phi Cc / \Phi Ck$ , де:  $\Phi Cc$  - фагоцитарне число в реакції фагоцитозу зі стандартною тест-культурою Escherichia coli,  $\Phi Ck$  - фагоцитарне число в реакції фагоцитозу з клінічним штамом Escherichia coli, висіяним у конкретного хворого, причому значення Кф від 1 до 2 свідчить про збережені резерви функціонального стану нейтрофілів і легкий ступінь дисбіотичних порушень, значення Кф від 2 до 4 свідчить про зниження функціональних резервів фагоцитуючих клітин і, відповідно, середній ступінь дисбіотичних порушень, а значення Кф вище 4 свідчить про виснаження функціональних резервів фагоцитуючих клітин, тяжкий ступінь дисбіотичних порушень, ризик поглиблення дисбіозу.

Спосіб, що заявляється, відноситься до галузі медицини, а саме імунології, і може бути застосований для визначення стану захисних механізмів організму та прогнозування ризику поглиблення дисбіозу.

При дисбіозах відбуваються зміни біологічних властивостей мікроорганізмів-симбіонтів. Зміни якісних особливостей мікрофлори на тлі неповноцінності фагоцитів по відношенню до даних мікроорганізмів сприяють поглибленню дисбіотичних порушень. Тому дослідження поглинальної активності нейтрофілів по відношенню до штаму мікроорганізму, висіяного у конкретного хворого, має прогностичне значення.

Фагоцити формують першу лінію захисту в організмі, вони швидко реагують на пошкоджуючий фактор та забезпечують його знищення. До фагоцитів відносяться нейтрофіли та макрофаги, але фагоцитарна і бактерицидна здатність більш виражені саме у нейтрофілів, максимальне наростання їх кілерної активності спостерігається на протязі перших трьох годин. При патології в системі фагоцитуючих клітин відбуваються істотні зсуви, ця система фіксує зміни внутрішнього середовища організму. Серед інтегральних показників імунобіологічного захисту найбільш адекватним параметром є фагоцитарна активність нейтрофілів

крові, яка детермінована генетично.

Нейтрофіли мають різносторонній, потужний ефекторний потенціал, який забезпечує реалізацію захисних функцій організму. Використання цього потенціалу визначається здатністю клітин до швидкої перебудови їх метаболізму, яка супроводжується активацією мембранних структур, продукцією високоактивних оксидантів. Нейтрофільні гранулоцити відрізняються високим рівнем відповіді на активаційні фактори, що характеризує їх як найбільш мобільні клітини, які обумовлюють пускові механізми розвитку запалення та ранні захисні реакції.

Відомий спосіб дослідження поглинальної і метаболічної активності нейтрофілів периферичної крові методами фагоцитозу і НСТ-тесту [Патент RU 2249215 C2 G01N 33/52 "Способ исследования поглотительной и метаболической активности нейтрофилов периферической крови методами фагоцитоза и НСТ-теста", 2003].

Недоліками прототипу є недостатня чутливість та інформативність дослідження при станах, що супроводжуються дисбіотичними порушеннями.

В основу корисної моделі, що заявляється, поставлено завдання створити спосіб, що забезпечує диференціацію дисбіотичних порушень за допомогою дослідження функціонального стану

(13) U  
43741  
(11)  
(19) UA

нейтрофілів, як здатності організму протистояти розвитку ускладнень, пов'язаних з порушеннями стану мікрофлори товстої кишки.

Заявлений спосіб та прототип мають загальні ознаки: дослідження поглинальної активності нейтрофілів периферичної крові методом фагоцитозу.

Новим у способі, що заявляється є застосування сукупності наступних ознак:

- використання у якості об'єкту фагоцитозу стандартної тест-культури *E. coli* і клінічного штаму *E. coli*, висіяного від конкретного хворого,

- визначення коефіцієнту функціонального стану нейтрофілів.

Таке сполучення ознак не виявлено в відомій літературі, прямо не витікає з відомого рівня техніки. Це сполучення загальних та відмінних ознак в заявленому способі дозволяє вирішити поставлене завдання та покращити результати діагностики та прогнозування перебігу хвороби.

Заявлений спосіб здійснюється наступним чином:

В стерильну пробірку з 0,5мл гепарину (Richter G.) у розведенні 1:10, вносили 5мл венозної крові. Кров ретельно змішували та центрифугували 10 хвилин при 1000об/хв. Плазму разом із шаром лейкоцитів переносили до пробірки, додаючи 5мл середовища 199. Лейкоцити відмивали центрифугуванням 10 хвилин при 1000об/хв. Супернатант видаляли, а лейкоцити, які знаходяться в осаді, ресуспендували в середовищі 199 двічі, кожного разу повторюючи процедуру "м'якого" центрифугування. Після останнього центрифугування піпеткою відсмоктували супернатант і частину рідини з клітинами, залишивши у центрифужній пробірці 0,2мл ( $10 \times 10^9$  кл/мл) клітинної суміші в середовищі 199. В якості об'єкту фагоцитозу використовували живу добову тест-культуру *Escherichia coli* і живу добову культуру *E. coli*, висіяну від конкретного хворого з вмісту товстої кишки. З косога агару з добової культури стерильним ізотонічним розчином натрію хлориду змивали колонії мікробів. Використовуючи стандарт оптичної мутності, розводили мікробну суміш до концентрації 1 млрд. мікробних клітин в 1мл; 0,3мл цієї суміші вносили в пробірку, яка вміщує 0,2мл лейкоцитів в середовищі 199. Інкубували 60 хвилин при 37°C. По закінченню вказаного часу в пробірку додавали 5мл ізотонічного розчину натрію хлориду, нагрітого до 37°C, перемішували і центрифугували 10 хвилин при 1500об/хв. Супернатант видаляли і робили мазки із лейкоцитарної завісі. Мазки висушували на повітрі, фіксували 10 секунд у метанолі, фарбували за Романовським-Гімза азуреозином. Тривалість фарбування 45-50 хвилин. Визначають фагоцитарне число (ФЧ) - середнє число мікроорганізмів, поглинутих одним фагоцитом (ча-

стка від ділення загального числа поглинутих бактерій на число нейтрофілів, що вступили до фагоцитозу). Визначають коефіцієнт функціонального стану нейтрофілів (Кф), за формулою:  $Kf = \frac{FCh}{FCh_k}$ , де ФЧс - фагоцитарне число в реакції фагоцитозу зі стандартною тест-культурою *Escherichia coli*, ФЧк - фагоцитарне число в реакції фагоцитозу з клінічним штамом *Escherichia coli*, висіяним у конкретного хворого. Кф від 1 до 2 свідчить про збережені резерви функціонального стану нейтрофілів і легкий ступінь дисбіотичних порушень. Кф від 2 до 4 свідчить про зниження функціональних резервів фагоцитуючих клітин і середній ступінь дисбіотичних порушень. Кф вище 4 свідчить про виснаження функціональних резервів фагоцитуючих клітин, тяжкий ступінь дисбіотичних порушень, ризик поглиблення дисбіозу.

Спосіб ілюструється наступними прикладами.

Приклад 1. Хворий М.С.В., 55 років, знаходився на лікуванні у відділенні захворювань кишечника Інституту гастроентерології АМН України. Клінічний діагноз: НБК. Дата дослідження: 6.06.07. ФЧс=9,7; ФЧк=8,4; Кф=1,2

Заключення: збережені резерви функціонального стану нейтрофілів, легкий ступінь дисбіотичних порушень. Прогноз - позитивний.

Приклад 2. Хворий Р.В.Н., 38 років, знаходився на лікуванні у відділенні захворювань кишечника Інституту гастроентерології АМН України. Клінічний діагноз: НБК. Дата дослідження: 21.03.07.

ФЧс=10,0; ФЧк=2,5; Кф=4

Заключення: виснаження функціональних резервів нейтрофілів, ризик поглиблення дисбіотичних порушень. Доцільне застосування імуноотропних засобів, що впливають на фагоцитоз.

Спосіб оцінки функціональних резервів нейтрофілів при дисбіотичних порушеннях використано в лабораторії мікробіології і імунології ДУ "Інститут гастроентерології АМН України" при обстеженні хворих на неспецифічний виразковий коліт.

Вищезазначені дані свідчать про те, що заявлений спосіб працездатний, він дозволяє проводити диференціацію важкості дисбіотичних порушень. Спосіб є ефективним та придатним для використання в лікувальних закладах.

Підвищення точності способу вирішується завдяки комплексній оцінці функціонального стану нейтрофілів. Здатність поглинати та перетравлювати клінічний штам, що присутній у вмісті товстої кишки при дисбіотичних станах, є інформативним прогностичним параметром стану фагоцитів, і, відповідно, дозволяє оцінити ризик поглиблення дисбіозу, адже зміни мікрофлори являються результатом зниження загальної резистентності макроорганізму.