

Спосіб прогнозування рецидиву хронічних дерматозів, що заявляється, відноситься до галузі медицини, зокрема, до дерматології, і може бути використаний для оцінки можливості рецидиву хронічного запального процесу.

Відомий спосіб прогнозування затяжного перебігу гострої пневмонії [1] обраний в якості аналогу. Сутність способу полягає в тому, що в перші 14 днів захворювання вимірюють кількість 2,3-діфосфогліцеринової кислоти, і при її зниженні менш 15,4мкм/м гемоглобіну прогнозують затяжний перебіг гострої пневмонії.

Відомий спосіб забезпечує прогнозування завершення гострої пневмонії і базується на обліку метаболізму клітин периферичної крові - еритроцитів. Недоліки способу полягають у низькій інформативності запропонованого показника, який не дозволяє проаналізувати саногенетичні і патогенетичні механізми регуляції функціональної активності клітин крові, що реалізують запальний процес в органах. Основна причина цього бачиться в тому, що еритроцити крові не приймають особистої участі в запальній реакції.

Найбільш близьким за технічною сутністю до способу, що заявляється, є спосіб діагностики запалення шкіри [2], обраний в якості прототипу. Сутність способу полягає в тому, що на однаковій за площею ділянці шкіри впливають підвищеним і зниженим парціальним тиском, через 25-30 хвилин із цих ділянок вилучають кров, підраховують число лімфоцитів у мазках, розраховують показник процентного співвідношення лімфоцитів з ділянки шкіри зі зниженим тиском до числа лімфоцитів з ділянки шкіри з підвищеним тиском і за різницею цих показників від 0,02 до 0,6 діагностують запалення шкіри.

Відомий спосіб забезпечує діагностику і прогнозування перебігу запалення в шкірі, що базується на аналізі клітин крові - кількості лімфоцитів. Недоліки способу полягають у тому, що, вивчається лише кількість клітин у вогнищі запалення, тоді як більш інформативним є функціональний стан лімфоцитів, що беруть участь у відновній стадії запалення. Очевидно, що перехід до відновної стадії є можливим тільки після завершення попередньої стадії запалення - розв'язання, що реалізується завдяки фагоцитозу моноцитами/макрофагами зруйнованих власних тканинних елементів сполучної тканини. Імовірність рецидиву запалення пов'язана з незавершеністю програми запалення, зокрема, стадії розв'язання, і базується на низькій резервній фагоцитарній активності моноцитів/макрофагів. Таким чином, відомий спосіб не дозволяє точно оцінити механізми регуляції фагоцитозу, а, отже, прогнозувати результат запалення і можливість рецидиву хронічних дерматозів. Так, за нашими даними, імовірність прогнозування рецидиву екзема і атонічного дерматиту за описаним вище способом не перевищує 60%.

В основу винаходу покладена задача створення способу прогнозування рецидиву хронічних дерматозів, у якому підвищення ефективності прогнозу забезпечується уточненням внутрішньоклітинних механізмів регуляції фагоцитозу шляхом кількісної оцінки метаболізму арахідонової кислоти в моноцитах крові.

Поставлена задача вирішується таким чином, що в способі прогнозування рецидиву хронічних дерматозів шляхом вивчення клітин периферичної крові, відповідно до винаходу, досліджують внутрішньоклітинні механізми регуляції фагоцитозу в моноцитах на 5-7-у добу лікування, для чого суспензію клітин пацієнтів розділяють на три проби, в які додають мікробну суміш і кальцієвий іонофор A23187, додатково у другу пробу вводять нордігідрогаретикову кислоту, а в третю - фактор активації тромбоцитів та індометацин, після інкубації визначають значення фагоцитарного індексу (ФІ) в пробах і розраховують відношення  $K = \Phi_{1-2} / \Phi_{1-3}$ , де  $\Phi_{1-2}$  - різниця значень індексу в першій і другій пробах,  $\Phi_{1-3}$  - різниця значень індексу в першій і третій пробах, і якщо  $K > 1$ , то прогнозують можливість рецидиву хронічних дерматозів.

Новим у способі, що заявляється, є те, що досліджують внутрішньоклітинні механізми регуляції фагоцитозу в моноцитах на 5-7-у добу лікування, для чого суспензію клітин пацієнтів розділяють на три проби, в які додають мікробну суміш і кальцієвий іонофор A23187, додатково у другу пробу вводять нордігідрогаретикову кислоту, а в третю - фактор активації тромбоцитів та індометацин, після інкубації визначають значення фагоцитарного індексу (ФІ) в пробах і розраховують відношення  $K = \Phi_{1-2} / \Phi_{1-3}$ , де  $\Phi_{1-2}$  - різниця значень індексу в першій і другій пробах,  $\Phi_{1-3}$  - різниця значень індексу в першій і третій пробах, і якщо  $K > 1$ , то прогнозують можливість рецидиву хронічних дерматозів.

Розробка способу, що заявляється, стала можливою завдяки наступним науковим фактам. По-перше, у пацієнтів на хронічні дерматози (екзема, алергічний дерматит) має місце інтенсивна продукція простаноїдів у вогнищах запалення, основним джерелом яких є моноцити/макрофаги. Причому простаноїди, зокрема, ПГЕ<sub>2</sub> мають інгібуючий вплив на фагоцитоз моноцитів/макрофагів. Нами раніше в експерименті встановлено, що високий рівень ендogenous ПГЕ<sub>2</sub> у суспензії моноцитів ( $5,91 \pm 0,16 \text{ пг/} 1 \cdot 10^6$  клітин проти  $2,15 \pm 0,07 \text{ пг/} 1 \cdot 10^6$  клітин у здорових осіб - контроль) супроводжується значимим зниженням значень фагоцитарного індексу клітин - на 38,67% ( $p < 0,01$ ; у порівнянні з контрольними).

По-друге, продукція простаноїдів моноцитами/макрофагами залежить від взаємодії внутрішньоклітинних метаболічних шляхів окислення арахідонової кислоти і визначається активністю їх ключових ферментів - циклооксигенази (ЦОГ) і ліпооксигенази (ЛОГ). Інгібування одного з ферментів створює умови для прояву потенційних можливостей активності (надалі - резервна потужність) іншого ферменту за рахунок додаткового постачання субстрату. Виходячи з даного положення інгібування ЦОГ при інкубації суспензії моноцитів *in vitro* з індометацином (ІМ) забезпечує додатковий потік арахідонової кислоти на ліпооксигеназний шлях, що супроводжується включенням резервної потужності ліпооксигенази. Функціональна відповідь моноцитів на інкубацію з ІМ (5мкМ) як у контрольній групі, так і в групі хворих на мікробну екзему (до лікування) виявляється вірогідним підвищенням фагоцитарного індексу - відповідно на  $31,32 \pm 1,10\%$  і  $17,90 \pm 0,04\%$  ( $p < 0,05$ ; у порівнянні з вихідним рівнем). При цьому приріст спонтанної фагоцитарної активності, що спостерігається, є віддзеркаленням ступеня резервної потужності ЛОГ моноцитів, яка, як випливає з отриманих результатів, у здорових осіб перевищує таку в хворих на екзему. Якщо до суспензії моноцитів додати інгібітор ЛОГ - нордігідрогаретикову кислоту (НДГК), то інтенсифікується циклооксигеназний шлях окислення арахідонової кислоти, а ступінь інгібування фагоцитозу при цьому є віддзеркаленням резервної потужності ЦОГ. Інкубація суспензії моноцитів із НДГК (5мкМ) супроводжується зниженням значень фагоцитарного індексу у здорових осіб і хворих на мікробну екзему відповідно на  $26,21 \pm 0,11\%$  і  $13,47 \pm 0,08\%$  ( $p < 0,05$  у порівнянні з вихідним рівнем).

По-третє, під час розвитку запального процесу зростає рівень фактору активації тромбоцитів (ФАТ) -

локального регулятора міжклітинних кооперацій моноцитів/макрофагів. Нами встановлено підвищення фагоцитарної активності клітин (ФІ збільшувався на  $25,03 \pm 5,22\%$ ) при інкубації суспензії моноцитів хворих на хронічні дерматози *in vitro* з ФАТ (1мкМ), що дозволяє вважати ФАТ стимулятором фагоцитозу мононуклеарів. Найбільш значимі ці зміни були на 5-7-у добу лікування пацієнтів. Виявлений ефект був пов'язаний з додатковою активацією ЛОГ (ФАТ-стимульована резервна потужність), що підтверджують результати інкубації моноцитів із НДГК. Підвищуючи концентрацію НДГК до 10 мкМ можна досягти повного нівелювання стимулюючого ефекту ФАТ на фагоцитоз і повернення значень ФІ до вихідного. Кількісна оцінка ФАТ-стимульованої резервної потужності ЛОГ стає можливою під час додавання в інкубаційну суміш 1мкМ ФАТ і 5мкМ ІМ. За таких умов ФІ хворих на мікробну екзему (до лікування) додатково збільшувався на  $10,87 \pm 1,91\%$  ( $p < 0,05$ ; у порівнянні з вихідними значеннями).

По-четверте, проспективне дослідження пацієнтів на хронічні дерматози продемонструвало наявність тісного кореляційного зв'язку між відношенням резервна потужність циклооксигенази/ФАТ-стимульована потужність ліпооксигенази, а також терміном виникнення рецидиву захворювання ( $r = -0,869$ ).

Вищевикладене підтверджує, що висока фагоцитарна активність моноцитів через 5-7 днів після початку лікування хворих на мікробну екзему, що нами спостерігається, пов'язана з домінуванням ліпооксигеназного шляху окислення арахідонової кислоти під впливом ФАТ, віддзеркаленням чого є зниження відношення резервної потужності циклооксигенази до ФАТ-стимульованої резервної потужності ліпооксигенази (К) - до  $0,84 \pm 0,03$  проти  $1,1 \pm 0,04$  до лікування (у групі здорових осіб величина відношення складає  $0,73 \pm 0,03$ ). При наявності запального процесу в шкірі оцінка інтенсивності шляхів метаболізму арахідонової кислоти в моноцитах дозволяє точно прогнозувати рецидив хронічних дерматозів. Технічна простота способу, що запропонований, дозволяє багаторазово досліджувати *in vitro* динаміку запалення в шкірі.

Досягнення технічного результату даного способу засновано на дослідженні метаболізму арахідонової кислоти в моноцитах на 5-7-у добу лікування, для чого суспензії клітин пацієнтів розділяють на три проби, в які додають мікробну суміш і кальцієвий іонофор A23187, додатково у другу пробу вводять нордігідрогаретикову кислоту, а в третю - фактор активації тромбоцитів та індометацин, після інкубації визначають значення фагоцитарного індексу (ФІ) в пробах і розраховують відношення  $K = \Phi_{1-2} / \Phi_{1-3}$ , де  $\Phi_{1-2}$  - різниця значень індексу в першій і другій пробі,  $\Phi_{1-3}$  - різниця значень індексу в першій і третій пробі, і якщо  $K > 1$ , то прогнозують можливість рецидиву хронічних дерматозів.

Наші результати показали, що якщо прогноз рецидиву хронічних дерматозів здійснювати на основі дослідження внутрішньоклітинних механізмів регуляції фагоцитозу, зокрема, метаболізму арахідонової кислоти в моноцитах, на 5-7-у добу лікування шляхом визначення відношення резервної потужності циклооксигенази до ФАТ-стимульованої резервної потужності ліпооксигенази, то точність збігу результатів, отриманих *in vitro*, з даними клініко-лабораторного обстеження пацієнтів підвищується до 86,7%.

Реалізують спосіб таким чином;

Моноцити виділяють зі свіжовідібраної крові шляхом осадження еритроцитів за допомогою декстрана Т-500 ("Loba-Chemie") і наступного фракціонування плазми на Ficoll-Paque. Еритроцити, що залишилися, видаляють дворазовим лізоєм 0,2% розчином NaCl. Клітини двічі відмивають центрифугуванням у розчині Хенкса (pH7,4) без фенолового червоного. Кількість життєздатних моноцитів у суспензії визначають у тесті з 0,1% розчином трипанового синього, яка складає 95-98%. Виміри проводять у суспензії моноцитів, що містить  $1 \cdot 10^6$  клітин в 1мл. Виготовлену суспензію моноцитів розділяють на 3 проби, у кожену додають мікробну суміш у співвідношенні 2:1 (жива однодобова культура золотистого стафілококу штаму №209 у концентрації 1 млрд. мікробних тіл в 1мл) і 5мкМ кальцієвого іонофора A23187. В 2-у пробу додатково вводять 100мкл нордігідрогаретикової кислоти (10мкМ), у 3-ю - 40мкл фактора активації тромбоцитів (DL- $\alpha$ -phosphatidylcholine,  $\beta$ -acetyl-  $\gamma$ -0-hexadecyl) (1мкМ) і 100мкл індометацину (5мкМ). Усі проби інкубують 1 годину у вологому середовищі при 37°C. Після інкубації ретельно відмивають моноцити від вмісту кожної проби, готують по 2 мазки, фіксують їх метиловим спиртом і дофарбовують барвником С.І.Задорожного. Результат фагоцитозу (фагоцитарний індекс) підраховують у мазках у 100 моноцитах при їх мікроскопії під іммерсією (ок. 15, об. 90). За різницею значень фагоцитарного індексу в 1-й і 2-й пробі визначають резервну потужність циклооксигенази, а за різницею значень індексу в 1-й і 3-й пробі визначають ФАТ-стимульовану резервну потужність ліпооксигенази моноцитів. Розраховують відношення  $K = \Phi_{1-2} / \Phi_{1-3}$ , де  $\Phi_{1-2}$  - різниця значень індексу в першій і другій пробі,  $\Phi_{1-3}$  - різниця значень індексу в першій і третій пробі, і якщо  $K > 1$ , то прогнозують можливість рецидиву хронічних дерматозів.

Приклад 1. Пацієнт С., 50 років, надійшов у клініку з діагнозом мікробна екзема (іст. хвороби №05/03). З метою прогнозування рецидиву захворювання через 7 днів після призначення терапії - антибактеріальна терапія (цефазолін), гіпосенсибілізуючі препарати (хлорид кальцію, натрію тіосульфат), антигістамінні препарати (тавегіл, лоратадин, гістаглобулін), вітаміни (В<sub>1</sub>, В<sub>12</sub>, В<sub>6</sub>, пангамат кальцію, аскорбінова кислота), імунокорегуючий засіб (діуцифон) виконано дослідження суспензії моноцитів, що виділені з периферичної крові за стандартною методикою. Отриману суспензію моноцитів розділили на 3 проби. У кожену пробу додавали мікробну суміш у співвідношенні 2:1 (жива однодобова культура золотистого стафілококу штаму №209 у концентрації 1 млрд. мікробних тіл в 1мл) і 5мкМ кальцієвого іонофора A23187. В 2-у пробу додатково вводили 100мкл нордігідрогаретикової кислоти (10мкМ), у 3-ю - 40мкл фактора активації тромбоцитів (1мкМ) і 100мкл індометацину (5мкМ). Усі проби інкубували 1 годину у вологому середовищі при 37°C. Після інкубації і відмивання моноцитів готували по 2 мазки з кожної проби. За різницею значень фагоцитарного індексу в 1-й і 2-й пробі розраховували резервну потужність циклооксигенази, що склала 0,27%. ФАТ-стимульована резервна потужність ліпооксигенази моноцитів, розрахована як різниця значень фагоцитарного індексу в 1-й і 3-й пробі, склала 0,22%. Розраховували відношення  $K = \Phi_{1-2} / \Phi_{1-3}$ , де  $\Phi_{1-2}$  - різниця значень індексу в першій і другій пробі,  $\Phi_{1-3}$  - різниця значень індексу в першій і третій пробі. Величина К склала 1,23 (більше 1), тому прогнозували високу імовірність рецидиву мікробної екземи. Через 3 місяці пацієнт повторно надійшов у клініку з рецидивом захворювання.

Приклад 2. Пацієнтка Т., 25 років, надійшла в клініку з діагнозом atopічний дерматит (іст. хвороби №21/03). З метою прогнозування рецидиву захворювання через 5 днів після призначення терапії - седативні препарати

(екстракт валеріани, настій собачої кропиви), антигістамінні препарати (кларитин, фенкарол), вітаміни (біотин, пангамат кальцію, аскорбінова кислота), зовнішня терапія (тріакорт) виконано дослідження суспензії моноцитів, що виділені з периферичної крові за стандартною методикою. Отриману суспензію моноцитів розділили на 3 проби. В кожну пробу додавали мікробну суміш у співвідношенні 2:1 (жива однодобова культура золотистого стафілококу штам №209 у концентрації 1млрд. мікробних тіл в 1мл) і 5мкМ кальцієвого іонофора A23187. В 2-у пробу додатково вводили 100мкл нордігідрогаретикової кислоти (10мкМ), у 3-ю - 40мкл фактора активації тромбоцитів (1мкМ) і 100мкл індометацину (5мкМ). Усі проби інкубували 1 годину у вологому середовищі при 37°C. Після інкубації і відмивання моноцитів готували по 2 мазки з кожної проби. За різницею значень фагоцитарного індексу в 1-й і 2-й пробах розраховували резервну потужність циклооксигенази, що склала 1,39%. ФАТ-стимульована резервна потужність ліпооксигенази моноцитів, розрахована як різниця значень фагоцитарного індексу в 1-й і 3-й пробах, склала 2,13%. Розраховували відношення  $K = \Phi_{1-2} / \Phi_{1-3}$ , де  $\Phi_{1-2}$  - різниця значень індексу в першій і другій пробах,  $\Phi_{1-3}$  - різниця значень індексу в першій і третій пробах. Оскільки відношення отриманих показників K було в межах менше 1 ( $K=0,65$ ), то прогнозували низьку імовірність рецидиву атонічного дерматиту. Проведені клініко-лабораторні дослідження через 6 місяців після закінчення лікування підтвердили відсутність рецидиву захворювання, а K зберігався меншим за 1 ( $K=0,71$ ).

Іспити способу, що заявляється, проведені у 30-ти пацієнтів на хронічні дерматози. Приведені приклади свідчать про те, що дослідження внутрішньоклітинних механізмів регуляції фагоцитозу в моноцитах периферичної крові хворих на хронічні дерматози дозволяє з високою точністю (86,7%) прогнозувати імовірність рецидиву захворювання, а спосіб, що заявляється, є інформативним.

Використання способу прогнозування рецидиву хронічних дерматозів, що заявляється, дозволяє проаналізувати механізми підтримки запалення у вогнищах ураження і, тим самим, здійснювати корекцію терапії хворих на хронічні запальні захворювання шкіри.

Переваги способу, що заявляється, полягають у тому, що він підвищує точність прогнозу рецидиву хронічних дерматозів до 86,7%, є технічно простим, економічним і високоінформативним, скорочує час для проведення досліджень.

Перераховані переваги визначають перспективність використання способу в дерматології.

Спосіб, що заявляється, базується на дослідженні клітин периферичної крові *in vitro*, що виключає введення в організм різних стимуляторів і інгібіторів, що модулюють функціональну активність клітин - учасниць запалення, і дозволяє уникнути системних побічних реакцій у пацієнтів.

Джерела інформації:

1. Ландышев С.Ю., Бородин Г.П., Ландышева И.В., Бородин Е.А. Способ прогнозирования затяжного течения острой пневмонии. - Авторское свидетельство SU 1544380 - МПК. А61В10/00 - Оп. 23.02.1990.

2. Калугин В.В. Способ диагностики воспаления кожи.- Патент РФ №1732272. - G01 N33/48. - публ.07.05.92., Бюл. №17