



УКРАЇНА

(19) UA (11) 18500 (13) U
(51) МПК (2006)
A61B 10/00
G01N 21/00
G01N 33/48

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ДИФЕРЕНЦІЙНОЇ ДІАГНОСТИКИ ЕКСУДАТИВНИХ ПЛЕВРИТІВ НЕЯСНОЇ ЕТІОЛОГІЇ

1

2

(21) u200604793

(22) 03.05.2006

(24) 15.11.2006

(46) 15.11.2006, Бюл. № 11, 2006 р.

(72) Суслов Євгеній Іванович, Ліскіна Ірина Вален-
тинівна, Опанасенко Микола Степанович

(73) ІНСТИТУТ ФТІЗИАТРІЇ І ПУЛЬМОНОЛОГІЇ ІМ.
Ф.Г.ЯНОВСЬКОГО АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК
УКРАЇНИ

(57) Спосіб диференційної діагностики ексудатив-
них плевритів неясної етіології, що полягає у дос-
лідженні внутрішньоплевральної рідини, який **від-
різняється** тим, що після центрифугування
плевральної рідини відбирають надосад, який роз-
водять фосфатним буфером, після чого в дослід-
ний зразок послідовно додають динатрієву сіль
етилендіамінтетраоцтової кислоти, сироватку до-
норської крові I групи і азотнокисле срібло з пода-

льшою витримкою розчину на денному світлі до
появи світло-коричневого кольору, дослідний та
контрольний зразки поміщають у спектрофото-
метр, реєструють величину оптичної щільності в
діапазоні хвиль видимого спектра 340-500нм з
кроком 10нм та проводять аналіз кривої оптичної
щільності, яку отримують внаслідок віднімання
показників контрольного розчину з відповідних
показників оптичної щільності дослідного зразка, і
при висхідному типі кривої спектрограми, наявно-
сті піків на довжині хвиль 400-420нм та 460-480нм
діагностують плеврит пухлинної етіології, при ви-
східному типі спектрограми, без піку на довжині
хвиль 400-420нм - плеврит туберкульозної етіоло-
гії, при низхідному типі кривої спектрограми без
піку на довжині хвиль 400-420нм діагностують
плеврит неспецифічної запальної етіології.

Корисна модель відноситься до медицини, а
саме до пульмонології та фтизіатрії і може бути
використана в клінічній практиці для диференцій-
ної діагностики ексудативних плевритів трьох ос-
новних типів - специфічного туберкульозного ха-
рактеру, неспецифічного запального плеврити та
метастатичних (пухлинних) плевритів.

Характерною рисою сучасної медицини є неу-
хильне зростання абсолютної кількості випадків
розвитку плевральних випотів в якості ускладнен-
ня у хворих з найрізноманітнішими основними за-
хворюваннями. Диференційна діагностика плев-
ральних випотів ускладнена подібністю їх клініко-
рентгенологічних проявів, частою супутньою кар-
діогенною патологією, особливо у пацієнтів зрілого
та похилого віку. Існуючі стандарти виконання діа-
гностичного комплексу клініко-рентгенологічних
методів обстеження дозволяють визначити наяв-
ність, приблизну кількість та характер рідини – це
трансудат чи ексудат в плевральній порожнині,
але не конкретно її етіологію.

Серед найбільш сучасних та адекватних алго-
ритмів проведення диференційної діагностики ек-
судативних плевритів є BTS- рекомендації для
однорічних плевральних випотів [див. Maskell N.A.,

Butland R.J.A. BTS guidelines for the investigation of
a unilateral pleural effusion in adults // Thorax. - 2003.
- Vol. 58 (Suppl. II) - P.8-17.]. Вони включають 6
основних поступових етапів комплексних дослі-
джень, починаючи з вивчення анамнезу хвороби,
фізикального обстеження та рентгенограми груд-
ної клітки на першому етапі та закінчуючи одно- чи
багаторазовими торакоскопіями (відеоторакоскопі-
єю) із отриманням численних біопсій плеври для
гістологічного, мікробіологічного та цитологічного
досліджень на шостому етапі. Наступним,
обов'язковим кроком такого діагностичного алго-
ритму є багатопланове дослідження плевральної
рідини.

Але запропонований алгоритм має наступні
недоліки:

- багатоетапність дослідження, що логічно
пов'язується зі значною тривалістю діагностичного
процесу;

- необхідність залучення до діагностики бага-
тьох лабораторно-радіологічних підрозділів із від-
повідним обладнанням, що можливо лише в неба-
гатьох високо спеціалізованих центрах;

- значні кошти для проведення повного обсте-
ження, враховуючи також ціну займаного койко-

(19) UA (11) 18500 (13) U

ліжка у високо спеціалізованому медичному закладі;

- навіть такий складний діагностичний алгоритм припускає відсутність визначення генезу плеврального випоту приблизно в 15% від усіх випадків.

Як найближчий аналог обраний спосіб диференційної діагностики ексудативних плевритів шляхом визначення активності аденосиндезамінази та її ізоферментів у плевральній рідині, що отримують при торакоцентезі, та в сироватці крові [див. Gorguner M., Cercici M., and Gorguner I. Determination of adenosine deaminase activity and its isoenzymes for diagnosis of pleural effusions // *Respirology*. -2000. -Vol.5. -P.321-324]. Зразки плевральної рідини центрифугують 15хв. зі швидкістю 1000об/хв., надосадою зберігають при -20°C ; кров також центрифугують 5 хвилин при 5000об/хв. і зберігають в тих же умовах.

Відомо, що зростання рівня ферменту аденосиндезаміназа (АДА) у внутрішньо плевральній рідині є проявом дисфункції імунної відповіді. Цей фермент існує у 3-х основних ізоформах. Фермент знайдено в усіх типах клітин, при цьому ізофермент АДА₁ переважає в лімфоцитах та моноцитах, тоді як АДА₂ міститься в моноцитах та макрофагах, окрім того, збільшення концентрації внутрішньоклітинного АДА₂ спостерігається при інфікуванні мікроорганізмами. З'ясовано також, що АДА-активність значно посилюється в рідині туберкульозного генезу, та концентрація ферменту значно змінюється у випадках плевритів різної етіології.

АДА-активність визначають традиційним колориметричним методом. Використовують фотоелектрокалориметр, у якому порівнюють забарвлення зразка зі стандартним розчином в умовних одиницях. Субстратом цього методу є аденосин. Зразок інкубують з субстратом протягом 1 години на водяній бані при 37°C . Для окремого визначення активності АДА₁ і АДА₂ ізоформ додають 200нмоль/л еритро-9-(2-гідрокси-3-ноніл) аденін гідрохлориду (ЕГНА) в розчин з реагентом до інкубації з субстратом, оскільки ЕГНА є потенційним інгібітором лише АДА₁ ізоформи. Техніка визначення рівня АДА₂ така ж, як і у випадку загального АДА. Результати вимірів обробляють за комп'ютерними статистичними програмами. Розрахунки активності АДА-ферменту проведено для усіх основних типів плевритів - туберкульозного, неспецифічного характеру та для метастатичних випотів. Визначено, що найбільша активність ферменту спостерігалася у випадках туберкульозного плевриту (у середньому - 85,2у.о.), нижча - характерна для неспецифічних плевритів (67,3у.о.), значно нижча - при пухлинних плевритах (28,1у.о.).

Однак цей спосіб має наступні недоліки:

- недостатня точність дослідження, оскільки у розрахунковій формулі активності ферменту є емпірично підібрані коефіцієнти, які відрізняються в різних дослідженнях - від 40 до 70;

- потрібно проводити досить багато розрахунків з використанням складного математичного апарату, що потребує тривалого часу;

- застосований фермент має найбільшу активність саме у лімфоцитах, характерні кількісні зміни останніх виявлені лише для плевритів туберкульо-

зної етіології;

- рівні діагностичної специфічності та загальної ефективності досить відрізняються в різних аналогічних дослідженнях.

В основу корисної моделі поставлена задача створення способу диференційної діагностики ексудативних плевритів неясної етіології, в якому шляхом дослідження надосаду внутрішньоплевральної рідини пацієнта з плевральним випотом, який, після його розведення фосфатним буфером, послідовно обробляють динатрієвою сіллю етилендіамінтетраоцтової кислоти, сироваткою донорської крові I групи та азотнокислим сріблом з подальшою витримкою розчину на денному світлі до появи світло-коричневого кольору та визначенням особливостей кривих спектрофотোগрам при замірах оптичної щільності дослідного та контрольного зразків у діапазоні хвиль видимого спектру 340-500нм досягається підвищення точності і специфічності способу, скорочення строків диференційної діагностики, в результаті чого з'являється можливість діагностувати хворобу на більш ранніх стадіях її розвитку та раніше розпочати адекватне етіопатогенетичне лікування.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі диференційної діагностики ексудативних плевритів неясної етіології, який включає дослідження внутрішньоплевральної рідини, згідно корисної моделі, після центрифугування плевральної рідини відбирають надосад, який розводять фосфатним буфером, після чого в дослідний зразок послідовно додають динатрієву сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти, сироватку донорської крові I групи і азотнокисле срібло з подальшою витримкою розчину на денному світлі до появи світло-коричневого кольору, дослідний та контрольний зразки поміщають у спектрофотометр, реєструють величину оптичної щільності в діапазоні хвиль видимого спектру 340-500нм з кроком 10нм та проводять аналіз кривої оптичної щільності, яку отримують внаслідок віднімання показників контрольного розчину з відповідних показників оптичної щільності дослідного зразка і при висхідному типі кривої спектрограми, наявності піків на довжині хвиль 400-420нм та 460-480нм діагностують плеврит пухлинної етіології, при висхідному типі спектрограми, без піку на довжині хвиль 400-420нм - плеврит туберкульозної етіології, при низхідному типі кривої спектрограми без піку на довжині хвиль 400-420 діагностують плеврит неспецифічної запальної етіології.

Передумовою створення нового способу диференційної діагностики ексудативних плевритів стала запропонована Сусливим Є.І. та співавторами [див. Роль ДНК-протеїн- Ca^{2+} -комплексів в канцерогенезі. Методи їх определения для ранней диагностики злокачественных опухолей легких / Суслив Е.И., Подгаевская Т.П., Пленов С.Н., Чепиль П.И., Кузовкова С.Д., Григорович Л.Л. // Журн. АМН Украины. - 1997. - №3. - С.282-290] концепція про роль ядерних кальцій-зв'язуючих білків у регуляції стабільності геному клітин у різних умовах функціонування та циклу розвитку останніх. Згідно цієї концепції, при розвитку злоякісних пухлин із ядерного хроматину малігнізованих клітин у кров та інші біологічні рідини (зокрема, в слину) надхо-

дять у підвищеній концентрації специфічні ядерні кальцій-зв'язуючі білки. Враховуючи значну подібність білкового, електролітного та рН- обумовленого показників крові, лімфи та інших біологічних рідин організму, логічно було припустити, що такі ж кальцій-білкові сполуки ядерного генезу знаходяться і у внутрішньоплевральній рідині, тим більш, що при пухлинному походженні останньої, як правило, більш аніж у 50% випадків зл�якісні клітини навіть вільно „плавають” у плевральному випоті.

Із літературних джерел відомо [див. Пат. 64427 Україна, МПК-7 G01N33/483. Спосіб діагностики зл�якісних пухлин людини / Суслов Є.І., Підгаєвська Т.П. (Україна). - З. №2003054937; Заявлено 29.05.2003; Опубл. 16.02.2004. Бюл. №2(1). - С.4.149], що у здорових осіб в умовах фізіологічної норми максимальне підвищення оптичної щільності зразка крові при обробці його відповідними реактивами знаходиться в діапазоні значень довжини хвиль 410-430нм, тоді як мінімальна оптична щільність зразку розташовується в діапазоні 460-480нм.

Нами експериментальне встановлено, що оптична щільність зразків з внутрішньоплевральною рідиною графічно демонструє криву змін, подібну до такої у зразках з кров'ю цих же пацієнтів. Тобто для дослідження можна відбирати лише плевральну рідину, яка достовірно відображає загальні зміни.

Згідно проведенням дослідженням доведено, що для плевритів пухлинного генезу характерним є переважно висхідний тип кривої спектрограми в діапазоні вимірів та наявність піків на довжині хвиль 400-420нм та 460-480нм. Переважно висхідний тип спектрограм, без піку на довжині хвиль 400-420нм - характерний для плевритів туберкульозної етіології. Переважно низхідний тип кривої, без піку на довжині хвиль 400-420нм свідчить за хронічний неспецифічний запальний процес у плевральній порожнині.

Спосіб диференційної діагностики здійснюють наступним чином.

При проведенні чергової лікувальної (розвантажувальної) плевральної пункції відбирають до пробірки приблизно 10мл рідини та негайно направляють на дослідження. Рідину у пробірці центрифугують 25-30 хвилин при швидкості 3000об/хв. з метою розподілення на фракції власне рідини та її клітинного вмісту. Відбирають 2мл надосад, який розводять фосфатним буфером з рН - 7,2-7,4 до остаточного загального об'єму 10мл. Перемішують. Знову відбирають 2мл останнього розчину, в який додають 0,2мл 12%-го розчину дінатрієвої солі етилендіамінтетраоцтової кислоти (трилону Б). Витримують 15-20 хвилин, постійно стряхуючи пробірку. До розчину додають ще 0,2мл донатора кальцій-білкових комплексів - свіжу сироватку крові людини з І-ю групою крові. Витримують ще 15-20 хвилин, з постійним стряхуванням розчину. Після чого додають 0,2мл 0,2% розчину азотнокислого срібла. Проводять витримку (експозицію) вмісту пробірки на денному світлі протягом 45-60 хвилин до появи світлорозового кольору. Реєструють величину оптичної щільності дослідного та контрольного розчинів

на приладі СФ-46 у діапазоні хвиль видимого спектру 340-500нм з кроком 10нм та проводять аналіз кривої оптичної щільності, яку отримують внаслідок віднімання показників контрольного розчину з відповідних показників оптичної щільності дослідного зразка. І при висхідному типі кривої спектрограми, наявності піків на довжині хвиль 400-420нм та 460-480нм діагностують плеврит пухлинної етіології, при висхідному типі спектрограми, без піку на довжині хвиль 400-420нм - плеврит туберкульозної етіології, при низхідному типі кривої спектрограми без піку на довжині хвиль 400-420 діагностують плеврит неспецифічної запальної етіології. Як контрольний розчин застосовують надосад плевральної рідини, розведений у фосфатному буфері без його обробки реактивами. Тривалість дослідження складає в середньому 3 години.

Наводимо конкретні приклади здійснення способу.

Приклад 1

Хвора В-к Н.І., 31 рік, історія хвороби №231-2003. Поступила до клініки торакальної хірургії Інституту фтизіатрії і пульмонології з попереднім діагнозом -лівобічний плеврит неясного Генезу. Після проведення дослідження внутрішньоплевральної рідини згідно запропонованого способу отримано наступну криву, характер якої свідчив за пухлинний характер випоту (див рис.1). В подальшому діагноз було підтверджено гістологічним дослідженням біопсійного матеріалу плеври. Патогістологічний висновок №55-2003 - метастатичний плеврит, метастази аденокарциноми. Діагноз підтверджено онкоморфологами.

Приклад 2

Хворий М-ко К.А., 20 років, історія хвороби №1181-2003. Поступив до клініки торакальної хірургії Інституту фтизіатрії і пульмонології з попереднім діагнозом - правобічний плеврит неясного генезу. Після проведення досліджень внутрішньоплевральної рідини отримано наступні криві, характер яких свідчив за специфічний туберкульозний характер випоту (див рис.2). Подальші цитологічне і гістологічне дослідження (№202-2003) біопсійного матеріалу плеври підтвердили висновок на основі спектрограми. Патогістологічний і цитологічний висновки: плеврит туберкульозної етіології.

Приклад 3

Хворий С-ко В.М., 38 років, історія хвороби №786-2003. Поступив до клініки торакальної хірургії Інституту фтизіатрії і пульмонології з попереднім діагнозом - правобічний плеврит, можливо параневмонічного характеру. Після проведення дослідження його внутрішньоплевральної рідини отримано наступні криві, характер яких свідчив за неспецифічний запальний характер випоту (див рис.3). В подальшому цитологічне та гістологічне (№142-2003) дослідження підтвердили цей висновок.

Усього заявленим способом було обстежено 35 пацієнтів із встановленим синдромом плеврального випоту неясного походження. Згідно отриманих результатів, загальна ефективність запропонованого способу диференційної діагностики склала 88,6%, тоді як діагностична специфічність по відношенню до пухлинних плевритів становила 81,8%; до неспецифічних плевритів - 84,0% та до

туберкульозних плевритів - 83,3%.

У порівнянні із прототипом запропонований спосіб диференційної діагностики дозволяє використовувати замість крові - плевральну рідину, що отримують при обов'язковому проведенні розвантажувальної пункції у таких хворих, тобто спосіб не потребує додаткового інвазивного втручання з діагностичною метою. Окрім того, у порівнянні з традиційними підходами диференційної діагностики плевральних випотів значно скорочуються її строки - до 3-х годин, а також кошторис на її проведення, оскільки спосіб не потребує значних коштів на реактиви. З приладів обов'язково потрібні лише центрифуга та спектрофотометр, якими зазвичай обладнана кожна лабораторія. Усі ці фак-

тори значно спрощують проведення диференційної діагностики, й дозволяють підвищити ефективність її проведення. Останнє, в свою чергу, дозволяє раніше розпочати адекватне етіопатогенетичне лікування, яке може забезпечити й кращі результати лікування.

Спосіб, що заявляється, не складний у виконанні, не потребує значних коштів на реактиви, при цьому він досить специфічний та інформативний у визначенні природи плевральних випотів.

Спосіб є доцільним для впровадження у медичних закладах фтизіо-пульмонологічного профілю, де наявні хірургічні підрозділи (відділення).



Рисунок 1. Графік, характерний при ексудативному плевриті пухлинного генезу

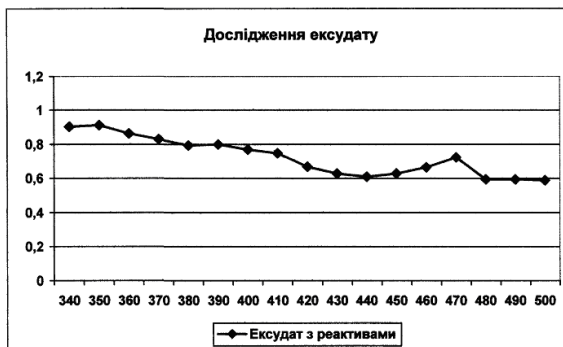


Рисунок 2. Графік, характерний при ексудативному плевриті специфічного, туберкульозного генезу

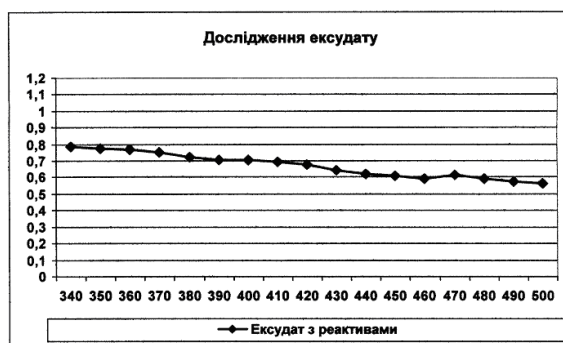


Рисунок 3. Графік, характерний при ексудативному плевриті не специфічного генезу