



УКРАЇНА

(19) UA (11) 30359 (13) U  
(51) МПК (2006)  
G01N 33/49МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ  
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

## (54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ ДОНОЗОЛОГІЧНОГО СТАНУ В ЧОЛОВІКІВ

1

2

(21) u200711634

(22) 22.10.2007

(24) 25.02.2008

(72) ОМЕЛЬЯНИК ЛЮДМИЛА ОЛЕКСАНДРІВНА,  
UA, КОЛІСНИК НАДІЯ ВАСИЛІВНА, UA,  
САМОЙЛЕНКО ЖАННА СЕРГІЙВНА, UA(73) ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД  
"ЗАПОРІЗЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ"  
МІНІСТЕРСТВА ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ, UA

(56)

(57) Спосіб діагностики донозологічного стану в чоловіків, який включає забір крові, аналіз клітин білої крові, оцінку донозологічного стану в окремих осіб за станом лейкоцитів, який **відрізняється** тим, що виконують забір капілярної крові в чоловіків з діагнозом "практично здоровий", готують мазок, висушують його при кімнатній температурі, проводять фіксацію мазка, фарбують мазок за Романовським-Гімза, мікроскопують його у світловому мікроскопі не пізніше двох годин після його фарбування, підраховують відносний вміст окремих груп лейкоцитів в 200 клітинах, визначають лейкоцитарну формулу, при відповідності її показників нормальному діапазону

здійснюють розрахунок відносної ентропії за формулою:

$$H_{\text{відн.}} = 52,0 -$$
$$0,25 \times C1 + 1,24 \times C2 + 1,12 \times C3 + 0,20 \times C4 + 1,09 \times C5 \quad (1),$$

де:

 $H_{\text{відн.}}$  - відносна ентропія, %;

52,0 - константа множинної регресії, величина відрізка осі у, що відсікається лінією регресії (інтерсепт), %;

0,25; 1,24; 1,12; 0,20, 1,09 - нестандартизовані коефіцієнти рівняння у формулі множинної регресії;

C1 - вміст сегментоядерних нейтрофілів у лейкоцитарній формулі, %;

C2 - вміст паличкоядерних нейтрофілів у лейкоцитарній формулі, %;

C3 - вміст еозинофілів у лейкоцитарній формулі, %;

C4 - вміст лімфоцитів у лейкоцитарній формулі, %;

C5 - вміст моноцитів у лейкоцитарній формулі, %;

і за значенням відносної ентропії роблять висновок про наявність або відсутність донозологічного стану в окремих осіб і груп чоловіків.

Спосіб відноситься до галузі медицини, а саме валеології, і може бути використаний для діагностики донозологічного стану в працездатних чоловіків для формування груп ризику, проведення комплексу профілактичних заходів, що запобігають розвитку захворювання.

Відомий спосіб донозологічної діагностики з кристалографії слини [Патент Росії 2143114, Спосіб діагностики донозологических изменений в организме детей. Сетко Н.П.; Абзалилова Н.Н.; Трубникова Н.А. (Россия). Заявка 98101940. Приор. 1998.02.04. Оpub. 1999.11.10, МПК6 А61В10/00], що включає вивчення твердокристалічних структур за допомогою мікрометоду кристалізації слини на предметному склі з 0,9%-ним розчином NaCl як кристалоутворюючої речовини, для чого на нове, чисто вимите водою і знежирене в спирті предметне скло наносять краплю біологічного субстрату, і краплю розчину NaCl. Препарат

втримують 24 години в горизонтальному положенні при кімнатній температурі і нормальній вологості. Для контролю якості дослідження необхідно проводити два паралельні досліді: пробу та контроль (1 крапля дистильованої води і 1 крапля 0,9% розчину NaCl). Мікроскопію проводять у світловому мікроскопі при збільшенні 7×8; при процентному вмісті розрізнених кристалів більше 70%, і розгалужених систем, лінійних структур або кристалів змішаного типу менше 30% від загальної площі препарату - стан оцінюють як нормальний, при процентному вмісті розрізнених кристалів, що займають менше 70% від загальної площі препарату, і розгалужених систем, лінійних структур або кристалів змішаного типу більше 30% від загальної площі препарату - говорять про зрив адаптації.

Недоліками способу є:

1. Слина - ультрафільтрат плазми крові, але на її склад суттєво впливає стан слизистої ротової

(13) U

(11) 30359

(19) UA

порожнини і слинних залоз, спосіб не враховує цієї обставини, що знижує його об'єктивність.

2. Методика отримання кристалів рекомендує витримку суміші 1 краплі слини і 1 краплі 0,9% розчину хлориду натрію (2 краплі) при кімнатній температурі і певній вологості протягом 24 годин. Кімнатна температура як і вологість - поняття невизначені; конкретна температура і вологість критично важливі для формування кристалів певної форми; варіації температури і вологості визначають формування як різної форми кристалів, так і їх різне співвідношення.

3. Недоліки по пп.1 і 2 виключають отримання відтворюваних результатів в однієї і тієї самої особи, а отже, і достовірність діагностики донозологічних станів.

4. Спосіб відноситься до діагностики донозологічних станів удітей.

5. Спосіб діагностує зрив адаптації.

Спільною з рішенням, що заявляється, ознакою є: дослідження біологічного матеріалу у світловому мікроскопі для донозологічної діагностики.

Прототипом запропонованого способу є спосіб виявлення донозологічного стану [Патент Росії 2154277, Спосіб оцінки донозологіческих состояний по определению активности форм тирозин-гидроксилазы белых клеток крови, Минеева М.Ф., Карпова Л.Д. (Россия). Заявка. 98110911, Приор. 1998.06.02. Оpubл. 2000.08.10. МПК 7 G01N33/68], відповідно до якого в гомогенатах лейкоцитів крові визначають активність ізоферментів тирозин-гідроксилази (ТГ), для чого венозну кров забирають у гепаринізовану пробірку, відстоюють протягом 30-60 хвилин, відбирають плазму з лейкоцитами в окрему пробірку і заморожують; для визначення активності ТГ пробу розморожують і гомогенізують для руйнування лейкоцитів; центрифугують протягом 10 хвилин при 800g, в центрифугаті визначають активність двох ізоферментів ТГ-ТГ1 і ТГ4 і розраховують коефіцієнт ( $K_{ТГ}$ ), рівний відношенню активностей ТГ4/ТГ1; при донозологічному стані  $K_{ТГ} < 0,3$ .

Недоліками способу є:

1. Необхідність венепункції і необхідність великого об'єму крові;

2. Процедура заморожування плазми крові з суспензією лейкоцитів і подальша гомогенізація лейкоцитів не виключають денатурації частини ізоформ ферменту;

3. Автори не навели умови гомогенізації (тип гомогенізатора, температуру, час) і метод перевірки повноти руйнування лейкоцитів, тобто повноту вилучення ферменту з клітин;

4. Недоліки по пп.2 і 3 обумовлюють низьку відтворюваність результатів визначення активності ізоформ ферменту в однієї і тієї самої особи при повторному визначенні;

5. Визначення активності ферменту потребує наявності відповідних тест-систем та устаткування для фотометрії;

6. Визначення активності ізоформ тирозин-гідроксилази може проводити тільки лікар-лаборант біохімік першої або вищої кваліфікаційної категорії.

Спільними з прототипом ознаками є: забір крові, аналіз клітин білої крові, оцінка донозологічного стану в окремих осіб за станом лейкоцитів.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб діагностики донозологічного стану в чоловіків, який шляхом визначення лейкоцитарної формули і розрахунку її відносної ентропії дозволяє в лікувальній установі будь-якої категорії здійснювати експрес-діагностику наявності або відсутності передхвороби як в окремих осіб, так і колективів, формувати групи ризику, проводити моніторинг стану їх здоров'я.

Суттєвими ознаками способу є:

забір капілярної крові в чоловіків з діагнозом «практично здоровий»; приготування мазка; висушування його при кімнатній температурі; фіксація мазка; фарбування мазка за Романовським-Гімза; мікроскопія мазка у світловому мікроскопі не пізніше двох годин після його фарбування; підрахунок процентного вмісту окремих груп лейкоцитів в 200 клітинах; визначення лейкоцитарної формули; оцінка відповідності діапазону норми процентного вмісту кожної групи лейкоцитів в лейкоцитарній формулі; розрахунок відносної ентропії, який виконують за формулою:

$$N_{\text{відн}} = 52,0 - 0,25 \times C1 + 1,24 \times C2 + 1,12 \times C3 + 0,20 \times C4 + 1,09 \times C5 \quad (1)$$

де:

$N_{\text{відн}}$  - відносна ентропія, %;

52,0 - константа множинної регресії, величина відрізка осі у, що відсікається лінійною регресії (інтерсепт), %;

0,25; 1,24; 1,12; 0,20, 1,09 - нестандартизовані коефіцієнти рівняння у формулі множинної регресії;

C1 - вміст сегментоядерних нейтрофілів у лейкоцитарній формулі, %;

C2 - вміст паличкоядерних нейтрофілів у лейкоцитарній формулі, %;

C3 - вміст еозинофілів у лейкоцитарній формулі, %;

C4 - вміст лімфоцитів у лейкоцитарній формулі, %;

C5 - вміст моноцитів у лейкоцитарній формулі, %

і висновок за значенням відносної ентропії про наявність або відсутність донозологічного стану в окремих осіб і груп чоловіків.

Відмінними від прототипу ознаками є: забір капілярної крові в чоловіків з діагнозом «практично здоровий»; приготування мазка; висушування його при кімнатній температурі; фіксація мазка; фарбування за Романовським-Гімза; мікроскопія мазка у світловому мікроскопі не пізніше двох годин після його фарбування; підрахунок процентного вмісту окремих груп лейкоцитів в 200 клітинах; визначення лейкоцитарної формули; оцінка відповідності діапазону норми процентного вмісту кожної групи лейкоцитів; розрахунок відносної ентропії за формулою 1 і висновок за її значенням про наявність або відсутність донозологічного стану в окремих осіб і груп чоловіків.

Теоретичною основою способу є робота К. Шенонна [К. Шеннон. Работы по теории информации и кибернетике. - М.: Издательство ин. лит., 1963, С.243-332], з теорії інформації біологічних систем і зокрема крові, відповідно до якої сумарна величина ентропії формули крові відображає міру інформації в системі, яка визначається за формулою:

$$H_{\text{сум}} = - \sum_{i=1}^n (a_i / 100) \times \log_2(a_i / 100), \quad (2)$$

де:

$H_{\text{сум}}$  - сумарне значення абсолютної ентропії лейкоцитарної формули, у. о.

1, 2, n - число груп лейкоцитів у лейкоцитарній формулі;

$a_i$  - вміст i-ї групи лейкоцитів у лейкоцитарній формулі, %.

Відповідно до рівняння 2 необхідно розрахувати ентропію кожної групи лейкоцитів, а потім її суму. Оскільки в лейкоцитарній формулі в нормі іноді присутні базофіли - до 0,5%, тобто число специфічних груп лейкоцитів складає 6, то було вирішено розраховувати не абсолютну, а відносну ентропію лейкоцитарної формули, заздалегідь прорахувавши абсолютну ентропію кожної групи, сумарну ентропію i, приймаючи за 100%  $\log_2 6$  [Тихончук В.С., Ушаков І.Б., Карпов В.Н., Зуев В.Г., Возможности использования новых интегральных показателей периферической крови человека //Военно-медицинский журн. -1992 №3 -С.27-31]. Обидва відомі способи використовують багатоступеневий розрахунок ентропії складових лейкоцитарної формули, кожен з яких вимагає виконання спеціальних математичних обчислень та комп'ютерних програм, і не призначені для визначення донозологічного стану чоловіків.

Запропонований нами спосіб дозволяє при прямому розрахунку відносної ентропії лейкоцитарної формули без проведення складних обчислень за короткий проміжок часу підтвердити або відкинути наявність донозологічного стану в окремих чоловіків або обстежуваних груп чоловіків з діагнозом «практично здоровий». Спосіб може використовуватися для моніторингу стану здоров'я, оскільки зміна показника відносної ентропії відображає стійкі зміни в гомеостазі.

Спосіб здійснюють таким чином:

Проводять забір краплі капілярної крові у чоловіка з діагнозом «практично здоровий», наносять її на предметне скло, готують мазок; висушують його при кімнатній температурі; виконують фіксацію мазка в 96° етанолі, забарвлюють мазок фарбником Романовського-Гімза, здійснюють мікроскопію мазка у світловому мікроскопі не пізніше двох годин після його фарбування; виконують підрахунок відносного вмісту окремих груп лейкоцитів в 200 клітинах, а саме сегментоядерних нейтрофілів, паличкоядерних нейтрофілів, еозинофілів, лімфоцитів і за наявності - базофілів; визначають лейкоцитарну формулу; проводять оцінку відповідності отриманих показників відносного вмісту кожної групи лейкоцитів, такому що прийнятий МОЗ України як діапазон нормальних

значень показників лейкоцитарної формули [Руководство к практическим занятиям по клинической лабораторной диагностике //Под ред. М.А. Базарновой, В.Т., Морозовой. -Киев. -Вища школа, -1988. с.318, с.30]:

- сегментоядерні нейтрофіли (С1) - 47-72%;
- паличкоядерні нейтрофіли (С2) - 1-6%;
- еозинофіли (С3) - 0-5%;
- моноцити (С4) - 3-11%;
- лімфоцити (С5) - 19-37%.
- базофіли - 0-0,5%.

При відповідності в обстежуваного відносного вмісту окремих груп лейкоцитів у лейкоцитарній формулі діапазону норми виконують розрахунок відносної ентропії за формулою 1 і при значенні відносної ентропії 45%-55% і 68%-75% діагностують наявність донозологічного стану в окремих осіб або груп чоловіків.

Приклад конкретного виконання.

У практично здорових чоловіків (180 позаштатних донорів, 15 з них щомісячно протягом року, метод випадкової вибірки) проводили забір крові, готували мазки, висушували при кімнатній температурі, фіксували в етанолі, фарбували за Романовським-Гімза, підраховували процентний вміст кожної групи лейкоцитів в 200 клітинах за допомогою світлового мікроскопа не пізніше двох годин після його фарбування, визначали лейкоцитарну формулу, порівнювали отримані значення з показниками норми, рекомендованими МОЗ України і за відсутності відхилень проводили розрахунок відносної ентропії, при значеннях показника відносної ентропії в діапазоні 56-67% діагностували стан здоров'я, тобто відсутність донозологічного стану, при зниженні або підвищенні показників відносної ентропії відносно діапазону норми діагностували донозологічний стан. Із 180 практично здорових чоловіків - позаштатних донорів донозологічний стан діагностований у 51, що склало 28,3%.

Відповідно до даних регресійного аналізу ця величина не залежить від віку чоловіків і пори року. Однак ця величина залежить від статі, що дозволяє рекомендувати її для тривалого моніторингу стану здоров'я тільки чоловіків.

З метою визначення діапазону  $N_{\text{відн.}}$ , що характеризує стан здоров'я, і донозологічний стан, ми здійснили кореляційний аналіз показників лейкограм для трьох діапазонів  $N_{\text{відн.}}$

Відповідно до теорії функціональних систем П.К. Анохіна [Анохин П.И. Очерки по физиологии функциональных систем. М.: Медицина, 1975. - 447с., С.40-41] число, сила та напрям кореляційних зв'язків у системі визначає ступінь її напруги. У лейкоцитарних формулах, відносна ентропія яких відповідає діапазону 56-76%, виявлено один негативний кореляційний зв'язок середньої сили між відносним вмістом лімфоцитів і сегментоядерних нейтрофілів; у лейкоцитарних формулах, відносна ентропія яких знаходиться у діапазонах 45-55% і 68-75%, кількість сильних кореляційних зв'язків складає 4, що відображає наявність напруги в системі гомеостазу, тобто стан передхвороби. Результати кореляційного аналізу показників лейкограми і діапазонів  $N_{\text{відн.}}$  відображені в таблиці.

Таблиця

Кореляційні зв'язки між показниками лейкоцитарної формули при різних значеннях  $H_{\text{відн.}}$  у працездатних чоловіків - позаштатних донорів

Діагноз	Кількість осіб	Відносна ентропія $H_{\text{відн.}}$	Клітини лейкограми, що корелюють	Коефіцієнт кореляції та його спрямованість	Достовірність коефіцієнта кореляції
Практично здорові	129	56-67%	C4-C1	$R=-0,874$	$P=0,000$
У донозологічному стані	51	45%-55% або 68%-75%	C4-C1	$R=-0,706$	$P=0,000$
			C2-C1	$R=-0,678$	$P=0,015$
			C4-C3	$R=0,590$	$P=0,045$
			C5-C3	$R=-0,602$	$P=0,023$

Дані таблиці свідчать про те, що в чоловіків працездатного віку діапазон ентропії лейкоцитарної формули, що відображає стан здоров'я, дорівнює 56-67%; при донозологічному стані - показник відносної ентропії вищий або нижчий за крайні значення діапазону, характерного для стану здоров'я.

Інженерно-технічний працівник заводу Дніпроспецсталь М., 25 років, діагноз: практично здоровий.

Лейкоцитарна формула: C1 - 60,00; C2 - 3,00; C3 - 2,00; C4 - 31,00; C5 - 4,00. Значення всіх груп лейкоцитів лежать у діапазонах норми. Отже, можна діагностувати наявність або відсутність донозологічного стану за величиною відносної ентропії:

$$H_{\text{відн.}} = 52,0 - 0,25 \times 60 + 1,24 \times 3 + 1,12 \times 2 + 0,20 \times 31 + 1,09 \times 4$$

$H_{\text{відн.}} = 53,83 \pm 0,32$ . Величина відносної ентропії лейкоцитарної формули інженера М. відповідає діапазону «донозологічний стан».

Робітник заводу «Запоріжсталь» Д., 38 років, діагноз: практично здоровий.

Лейкоцитарна формула C1 - 54,00; C2 - 4,00; C3 - 3,00; C4 - 36,00; C5 - 6,00.

Усі показники лейкограми лежать у діапазоні норми. Обох вимог для розрахунку ентропії дотримано.

$$H_{\text{відн.}} = 52,0 - 0,25 \times 54 + 1,24 \times 4 + 1,12 \times 3 + 0,20 \times 36 + 1,09 \times 6$$

$$H_{\text{відн.}} = 60,56 \pm 0,32$$

Величина відносної ентропії лейкоцитарної формули робітника Д. відповідає діапазону стану «здоровий». Висновок: здоровий.

Таким чином, запропонований нами спосіб дає можливість за наявності лабораторії будь-якої категорії протягом менше 1 години виявити або виключити наявність донозологічного стану в практично здорових чоловіків працездатного віку (18-60 років) без наявності змін у лейкоцитарній формулі, що дозволяє виявити стан передхвороби, віднести чоловіка до групи ризику та вжити заходи для запобігання розвитку хвороби.