



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 44527

(13) A

(51) B 6 A61B10/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ РЕПЕРFUЗІЙНИХ УСКЛАДНЕНЬ НЕКРЕКТОМІЇ ОПІКОВОЇ РАНИ

1

2

(21) 2001053191

(22) 14 05 2001

(24) 15 02 2002

(46) 15 02 2002, Бюл. № 2, 2002 р.

(72) Барінов Едуард Федорович, Гусак Володимир
Корнійович, Фісталь Еміль Якович, Барінов
Олександр Едуардович(73) ДОНЕЦЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ ІМ. М. ГОРЬКОГО

(57) Спосіб прогнозування реперфузійних усклад-

нень некретомії опікової рани шляхом оцінки функціонального стану мікроциркуляторного русла, який відрізняється тим, що випущену суспензію тромбоцитів периферичної крові інкубують з агоністами α - і β -адренорецепторів протягом 7-10 хвилин при 37°C, і при зниженні агрегації тромбоцитів менше ніж на 10-15% прогнозують розвиток реперфузійних ускладнень некретомії

Спосіб прогнозування реперфузійних ускладнень некретомії опікової рани, що заявляється, відноситься до галузі медицини і біології, зокрема, хірургії, і може бути використаний для прогнозування реперфузійних ускладнень некретомії опікової рани

Відомий спосіб визначення індивідуальної чутливості до бета-адреноблокатору у хворих ішемічною хворобою серця [Р. А. Каценович і співавт.] Спосіб визначення індивідуальної чутливості до бета-адреноблокатору у хворих ішемічною хворобою серця. Авторське свідоцтво СРСР SU 1635962 - МКл А 61 В 10/00 - Бюл. № 11-1991] полягає у тому, що з метою спрощення способу і підвищення його точності, проводять пробу з селективним бета-адреностимулятором ізадрином, що вводять послідовно внутрішньовенно у дозах 0,03 і 0,06 мг/кг, і при збільшенні частоти серцевих скорочень на 7% у відповідь на першу дозу і при 18% - на другу, ідентифікують хворих, чутливих до бета-адреноблокатору

Недоліком описаного способу є необхідність системного введення лікарських препаратів, що при різній хемосенситивності α - і β -адренорецепторів на гладких м'язових клітинах судин, може провокувати порушення коронарного кровотоку через 30-60 хвилин після введення ізадрину, і, завдяки цьому, прискорити перебіг хвороби

Найбільш близьким за технічною сутністю до способу, що заявляється, є спосіб діагностики ускладнень у рані [Чекмарев В. М. Спосіб ранньої діагностики гнійно-воспалительних ускладнень

ране - Авторское свидетельство RU 2140199-МПК А 61 В 8/06 - Оп. 1999 10 27], вибраний в якості прототипу. Суттєвість способу полягає у тому, що на 2-у добу після травми оцінюють функціональний стан мікроциркуляторного русла шляхом реєстрації лазерним доплеровським флуометром локального кровотоку в ділянці краю рани і на симетричній поверхні тіла, або на відстані 15 см від ділянки, що травмувалася. У випадку виявлення різниці у показниках, таких як середнє арифметичне параметру мікроциркуляції відносно ділянки здорової ділянки тіла більше 3,0 і коефіцієнту асиметрії більше 0,35, діагностують можливість розвитку ускладнень в ділянці пошкодження тканин

Спосіб-прототип забезпечує оцінку функціонального стану поверхневої сітки мікроциркуляторного русла і базується на факті зіставлення локального кровотоку в ділянці рани й інтактній ділянці тіла

Недоліки способу полягають у тому, що вивчення функціонального стану мікроциркуляторного русла не дозволяє прогнозувати розвиток ішемії/реперфузії у тканинах рани, оскільки не відомо за рахунок яких конкретно механізмів регуляції підтримується величина кровотоку, що реєструється у даний конкретний момент часу. Досягнення цієї мети вимагало б введення у судинне русло лікарських препаратів, здатних змінити судинний тонус (діаметр судин), однак, за відсутністю інформації про чутливість (хемосенситивність) адренорецепторів завжди є небезпека виникнення вазоконстрикції (звуження просвіту судин) з наступним розвитком реперфузійних (постішемічних) ускладнень

(13) A

(11) 44527

(19) UA

Таким чином, спосіб-прототип не дозволяє кількісно і, головне, безпечно оцінити хемосенситивність (чутливість) рецепторів, що регулюють мікроциркуляцію

По-друге, дані, отримані під час аналізу поверхневої сітки судин шкіри і слизової оболонки, не відображають стан кровотоку у внутрішніх органах

Так, за нашими даними, імовірність прогнозування постішемичних реперфузійних ускладнень за описаним вище способом-прототипом не перевищує 50%

У основу винаходу покладена задача створення способу прогнозування реперфузійних ускладнень некротомії опікової рани, в якому забезпечується точність прогнозування порушень мікроциркуляції шляхом кількісної оцінки хемосенситивності α - і β -адренорецепторів, що регулюють діаметр судин. Завдяки цьому відкривається можливість оптимізувати лікувальну тактику і скоротити терміни лікування хворих після термічних ушкоджень

Поставлена задача вирішується тим, що у способі прогнозування реперфузійних ускладнень некротомії опікової рани, який включає оцінку функціонального стану мікроциркуляторного русла, згідно з винаходом, виділену суспензію тромбоцитів периферичної крові інкубують з агоністами α - і β -адренорецепторів протягом 7-10 хвилин при 37°, і при зниженні агрегації тромбоцитів менше ніж на 10-15%, прогнозують розвиток реперфузійних ускладнень некротомії

Новим у способі, що заявляється, є те, що виділену суспензію тромбоцитів периферичної крові інкубують з агоністами α - і β -адренорецепторів протягом 7-10 хвилин при 37°, і при зниженні агрегації тромбоцитів менше ніж на 10-15%, прогнозують розвиток реперфузійних ускладнень некротомії

Розробка способу, що заявляється, стала можливою завдяки наступним науковим фактам. По-перше, у пацієнтів з термічними опіками (обстежено 14 пацієнтів з термічними ушкодженнями II-III ступеня, що захоплювали 12-40% загальної поверхні тіла), які супроводжуються значним і тривалим викидом катехоламінів, виявлений різний ступінь зниження хемосенситивності α - і β -адренорецепторів (десенситизація рецепторів). Дослідження проводилося *in vitro* на суспензії тромбоцитів, виділених за допомогою стандартної методики з периферичної крові. В якості індуктора агрегації тромбоцитів застосовували Адреналін, що у використаних дозах (1-25 мкМ) впливав переважно на α -адренорецептори. У контрольній групі (здорові особи) EC_{50} (ефективна концентрація Адреналіну, що підвищує агрегацію тромбоцитів *in vitro* на 50%) складала $4,2 \pm 0,3$ мкМ. Дезагрегацію тромбоцитів відтворювали додаванням в інкубаційну суміш Ізадрин (селективний агоніст β_2 -адренорецепторів)

Через 3 доби після опіку мало місце зниження хемосенситивності α -адренорецепторів, відображенням чого є збільшення EC_{50} . Грунтуючись на величині ефекту, що реєструвався, обстежених пацієнтів розподілили на дві групи. У 1-й ($n = 6$) EC_{50} досягала $6,8 \pm 0,6$ мкМ (зростала на 62% у порівнянні з контролем), а в 2-й групі ($n = 8$) - $10,1$

$\pm 1,0$ мкМ (збільшувалася на 141% у порівнянні з контролем). По суті, після опіку у пацієнтів відбувається десенситизація (зниження чутливості) α -адренорецепторів, більш значуща в 2-й групі. Це означає, що у випадку використання Адреналіну, наприклад, для зниження крововтрат при виконанні некротомії, дозу препарату необхідно буде збільшити

Для оцінки хемосенситивності β -адренорецепторів використовували показник IC_{50} (інгібуюча концентрація препарату, що зменшує агрегацію тромбоцитів *in vitro* на 50%). У контрольній групі IC_{50} знаходилася на рівні $25,1 \pm 2,2$ мкМ, у 1-й групі вона досягала рівня $47,3 \pm 3,4$ мкМ (підвищувалася на 88,4% у порівнянні з контрольною групою) і в 2-й групі $90,5 \pm 4,0$ мкМ (зростала на 261% у порівнянні з контролем)

Таким чином, можна констатувати, що а) після опіку відбуваються різного ступеня зміни десенситизації α - і β -адренорецепторів, що регулюють судинний тонус, б) резервні можливості вазодилатації (судячи за хемосенситивністю β -адренорецепторів) після опіку – обмежені, і при будь-яких стрес-реакціях, наприклад, при виконанні некротомії або введенні катехоламінів, можливим є критичне порушення мікроциркуляції з розвитком реперфузійних ускладнень, у тому числі прогресування вторинного некрозу

По-друге, морфометричне дослідження біопсійного матеріалу опікової рани у групах, що обстежувалися, відразу наприкінці некротомії (контрольні показники) і через 24-48 годин після неї, підтвердило наявність зв'язку між хемосенситивністю β -адренорецепторів і питомою площею некрозів. У 1-й групі питома площа некрозів у біоптатах шкіри через 24-48 годин після некротомії зросла на 8,5% ($p < 0,05$) у порівнянні з контрольними даними (вирізання ділянок некрозу проводили без використання Адреналіну). Реакція з боку судин мікроциркуляторного русла у 1-й групі виявлялася зменшенням питомої площі S_v – відповідно $18,8 \text{ мкм}^2/\text{мкм}^2$, у контрольній групі – $20,7 \text{ мкм}^2/\text{мкм}^2$. В 2-й групі, як вже відзначалося, мало місце значне зниження хемосенситивності β -адренорецепторів, питома площа некрозів у біоптатах зросла на 16,6% ($p < 0,01$) у порівнянні з контрольними показниками. Даний процес розвивався на фоні зниження питомої площі судин мікроциркуляторного русла дерми – до $10,9 \text{ мкм}^2/\text{мкм}^2$

Вище викладене підтверджує, що зниження хемосенситивності β -адренорецепторів відповідає за тривале збереження вазоконстрикції після некротомії, що супроводжується ендогенним підвищенням рівня катехоламінів, а тест з тромбоцитами можна використовувати для прогнозу реперфузійних ускладнень в опіковій рані. У той же час використання тромбоцитів дозволяє уникнути виникнення у пацієнтів побічних реакцій, пов'язаних з інфузією високих доз Адреналіну (для зниження крововтрат у процесі виконання некротомії) на фоні зниження хемосенситивності α -адренорецепторів. Технічна простота запропонованого способу дозволяє багаторазово досліджувати адренореактивність пацієнта

Досягнення технічного результату даного способу засноване на оцінці ступеня зниження хемо-

сенситивності β -адренорецепторів, що регулюють вазодилатацію, за зміною агрегації тромбоцитів при їх інкубації з адреналіном й ізадрином. Наші дослідження показали, що якщо прогноз постішемичних реперфузійних ускладнень формулювати на основі оцінки хемосенситивності β -адренорецепторів за змінами агрегації тромбоцитів, то точність збігу результатів, отриманих *in vitro*, з клініко-морфологічними даними обстеження пацієнта підвищується до 90%.

Реалізують спосіб таким чином

Для виділення тромбоцитів з літкової вени беруть кров у пластикові пробірки, що містять кислий цитратдекстрозний антикоагулянт у співвідношенні його і крові 1:6. Кров центрифугують протягом 15 хвилин при 200g для отримання плазми, збагаченої тромбоцитами (ПЗТ). Після вилучення ПЗТ проводять подальше центрифугування на протязі 10 хвилин при 2000 g з метою отримання плазми, бідної на тромбоцити, яку використовують для підтримання стандартної кількості тромбоцитів на рівні 300 тис/мкл. Відмиті тромбоцити суспензують у буферному розчині наступного складу (мкМ): NaCl – 138, KCl – 3, MgCl₂ – 1, глюкоза – 10, HEPES-10, NaH₂PO₄ – 0,37 (pH 7,4). Агрегацію і дезагрегацію тромбоцитів реєструють шляхом вимірювання оптичної щільності світлового потоку, що мінає через суспензію клітин, на спектрофотометрі CF-46 або агрегометрі THROMBLITE-1600[®] (Росія). Принцип методу базується на зменшенні оптичної щільності взірця суспензії тромбоцитів (що стандартизувалися за кількістю) по мірі зниження їх вільної кількості внаслідок втягнення до агрегаційного процесу. В якості індуктора агрегації використовують Адреналін (фірма «Sigma» США). За збільшенням коефіцієнту пропускання світла у пробі, що досліджується, при постійному її перемішуванні роблять висновок про величину агрегації тромбоцитів. Обробку отриманих кривих проводять за допомогою комп'ютера. Кожна експериментальна точка на графіках є середнім значенням для трьох незалежних вимірів. Середньоквадратична помилка, вимірів не перевищувала 10% від отриманої величини.

Для вивчення модулюючої дії ліганда β_2 -адренорецепторів на функціональну відповідь тромбоцитів, що виявляється дезагрегацією тромбоцитів, у суспензію клітин вводять 1-3 мкМ Адреналіну, після цього додають 10-25 мкМ Ізадрину, інкубацію продовжують при 37°C і перемішуванні зі швидкістю 1000 об/хв. При зниженні агрегації тромбоцитів менше ніж на 10-15% прогнозують розвиток реперфузійних ускладнень у випадку застосування Адреналіну для гемостазу рани при некротомії. Використання Адреналіну у пацієнта при некротомії рекомендують у тому випадку, якщо у тесті *in vitro* при інкубації тромбоцитів з Адреналіном й Ізадрином агрегація тромбоцитів знижується більше 15%.

Наводимо конкретні приклади реалізації способу прогнозування реперфузійних ускладнень некротомії опікової рани, що заявляється.

Приклад 1. Пацієнт Г, 68 років, надійшов у клініку з опіком III-IV ступеню, площа ураження складала 30% загальної поверхні тіла. У зв'язку з повільним формуванням демаркаційного валу і нарос-

танням явищ інтоксикації на 3-ю добу після травми було прийняте рішення виконати некротомію. Попередньо проводили дослідження хемосенситивності адренорецепторів пацієнта у тесті *in vitro* з тромбоцитами, виділеними з периферичної крові. У суспензію тромбоцитів вводили 1 мкМ Адреналіну, після цього додавали 20 мкМ Ізадрину, інкубацію продовжували при 37°C і перемішуванні зі швидкістю 1000 об/хв. Оскільки *in vitro* агрегація тромбоцитів знизилася на 8%, можна було очікувати *in vivo* розвиток реперфузійних ускладнень у випадку застосування Адреналіну для гемостазу рани або ендогенного підвищення рівня катехоламінів при виконанні некротомії. З метою перевірки припущення під час операції на одній з ділянок опікової рани (далі А-ділянка) під струпу, що вирізували, вводили розчин Адреналіну, інтраопераційна крововтрата склала – $0,91 \pm 0,09$ мл/см². На іншій ділянці (далі Б-ділянка) - некротомію проводили без інфузії Адреналіну, обсяг крововтрати склав $1,55 \pm 0,20$ мл/см². При морфометричному дослідженні біоптатів вилучених через 24 години після некротомії, виявили, що питома площа некрозів у А- і Б-ділянках зростала, причому у більшому ступені на А-ділянці, ніж на Б – відповідно на 7,3% і 17,8% (у порівнянні з контрольними показниками, $p < 0,05$). На основі отриманих даних можна прийти до наступного висновку – у пацієнта Г на 3-ю добу після опіку, судячи з дослідження тромбоцитів, зберігалася низька хемосенситивність β -адренорецепторів. Тому при ендогенному і/або екзогенному підвищенні у тканинах концентрації катехоламінів, пов'язаному з виконанням некротомії, спостерігалася прогресування вторинного некрозу у опіковій рані.

Приклад 2. Пацієнтка С, 20 років, надійшла у клініку з опіками II-III ступеню, площа ураження складала 30% загальної поверхні тіла. На 5-у добу після опіку виконана первинна хірургічна некротомія. Попередньо була досліджена хемосенситивність адренорецепторів пацієнта у тесті *in vitro* з тромбоцитами, виділеними з периферичної крові. У суспензію тромбоцитів додавали 3 мкМ Адреналіну, після цього – 25 мкМ Ізадрину, інкубацію продовжували при 37°C і перемішуванні зі швидкістю 1000 об/хв. *In vitro* агрегація тромбоцитів зменшилася на 22,1%, що свідчило про високу хемосенситивність β_2 -адренорецепторів на клітинах-цільях і дозволяло прогнозувати розвиток компенсаторної вазодилатації при проведенні некротомії або у випадку використання Адреналіну для гемостазу рани.

У процесі виконання некротомії на А-ділянці опікової рани використали розчин Адреналіну, інтраопераційна крововтрата склала – $1,03 \pm 0,07$ мл/см². На Б-ділянці вирізування струпа проводили без інфузії Адреналіну, при цьому обсяг крововтрати склав $1,75 \pm 0,22$ мл/см². Морфометричне вивчення біоптатів шкіри рани, вилучених через 24 години після некротомії, показало, що питома площа некрозів у А- і Б-ділянках була приблизно однаковою, відповідно $118,5 \pm 3,6$ мкм²/мкм³ і $122,3 \pm 5,5$ мкм²/мкм³ і не відрізнялася статистично значущо від контрольних показників (розрахованих у біоптаті шкіри, що вилучили відразу ж після завершення некротомії). На основі отриманих даних

можна прийти до наступного висновку – у пацієн-ки С на 5-у добу після опіку, судячи з дослідження *in vitro*, відновлювалася хемосенситивність β_2 -адренорецепторів. На цьому фоні ендогенне і/або екзогенне підвищення концентрації катехоламінів у тканинах при виконанні некректомії не супроводжувалося збільшенням площі вторинного некрозу в опіковій рані. Необхідно підкреслити, що використання Адреналіну дозволило знизити крововтрати при здійсненні некректомії і, що не менш важливо, не призвело до розвитку ішемічних/реперфузійних ускладнень у опіковій рані після операції.

Наведені факти свідчать, що тест *in vitro* з тромбоцитами периферичної крові дозволяє прогнозувати розвиток реперфузійних ускладнень в опіковій рані *in vivo*, а це означає, що запропонований спосіб є інформативним.

Використання способу прогнозування реперфузійних ускладнень некректомії опікової рани, що заявляється, дозволяє корегувати порушення мікроциркуляції при визначенні зниження хемосенситивності β_2 -адренорецепторів.

Переваги способу, що заявляється, полягають у тому, що він є технічно простим, економічним й інформативним, скорочує час на проведення до-

сліджень, підвищує ефективність виконання некректомії.

Перераховані переваги визначають перспективність застосування способу в комбустіології для прогнозування реперфузійних ускладнень некректомії опікової рани.

Спосіб дозволяє також визначити зміни хемосенситивності адренорецепторів без введення в організм лікарських препаратів, що дозволяє уникнути побічних реакцій у пацієнтів.

Випробування способу, що заявляється, проведені на 14 пацієнтах з термічними ушкодженнями шкіри.

Література

1. Р.А. Каценович и соавт. Способ определения индивидуальной чувствительности к бета-адреноблокатору у больных ишемической болезнью сердца // Авторское свидетельство СССР SU 1635962 – М. Кл. А 61 В 10/00 – Бюл.-1991 – № 11.
2. Чекмарев В.М. Способ ранней диагностики гнойно-воспалительных осложнений в ране // Авторское свидетельство RU 2140199 – МПК А 61 В 8/06 – Оп. 1999 10 27.