



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **111435** (13) **C2**
(51) МПК (2016.01)
A61B 5/00
G01N 33/48 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: a 2015 00797	(72) Винахідник(и): Бурковський Микола Іванович (UA), Петрушенко Вікторія Вікторівна (UA), Желіба Микола Дмитрович (UA), Чорнопищук Роман Миколайович (UA)
(22) Дата подання заявки: 02.02.2015	(73) Власник(и): ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. М.І. ПИРОГОВА, вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, 21018 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 25.04.2016	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: Investigation of morphometric parameters for granulocytes and lymphocytes as applied to a solution of direct and inverse light-scattering problems/ GI Ruban, SM Kosmacheva, NV Goncharova et al.// J Biomed Opt. 2007 Jul- Aug;12(4):044017 Критерії оцінки стану системи нейтрофільних гранулоцитів крові у пацієнтів з рановою інфекцією / І.В. Гомоляко, К.П. Тумасова, Н.Є. Клочкова [та ін.] // Клінічна хірургія. - 2006. - № 11- 12. - С. 54. Герасимов І.Г. Морфологія нейтрофілов крові чоловека в процесі їх фагоцитоза in vitro / І.Г. Герасимов, Т.М. Гальбурт // Вісник Донецького національного університету, Сер. А: Природничі науки, 2009. - Вип. 1. - С. 377-382 Новий комп'ютеризований спосіб визначення показань до адекватного призначення антибіотиків та імуномодуляторів / М.Ю. Ничитайло, Є.Б. Медвецький, А.А. Стасенко [та ін.] // Клінічна хірургія. - 2007. - № 5-6. - С. 75-76. Гомоляко І. В., Тумасова К. П. Ультроструктурна та морфометрична характеристика нейтрофільних гранулоцитів крові // Цитологія і генетика. - 2001. - 35, № 5. - С. 44-48. Тумасова К.П. Морфо-функціональна характеристика оксидантної активності нейтрофільних гранулоцитів крові: автореф.дис... канд. біол. наук: 14.03.09/ К.П.Тумасова; нац. мед. ун-т ім. О.О. Богомольця - К., 1998. - 15 с. UA 110876 C2, 25.02.2016
(41) Публікація відомостей про заявку: 27.07.2015, Бюл.№ 14	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.04.2016, Бюл.№ 8	

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ ПЕРЕБІГУ РАНОВОГО ПРОЦЕСУ

(57) Реферат:

Винахід належить до медицини, а саме до способу діагностики ранового процесу шляхом визначенням показника фактора форми нейтрофільних гранулоцитів у рановому вмісті хворих з гнійними ранами. Стабільне підвищення цього показника у рановому вмісті вище рівня 0,89 свідчить про перехід рани у фазу грануляції та сприятливий прогноз для подальшого загоєння ранового дефекту.

UA 111435 C2

Винахід належить до медицини, зокрема до клінічної діагностики, а саме до способів діагностики перебігу ранового процесу.

На сьогоднішній день основним критерієм для діагностики перебігу ранового процесу залишається його клінічна характеристика, що доповнюється різними інструментальними і лабораторними методами дослідження, більшість з яких малопридатні для динамічного спостереження, не дозволяють чітко встановити стадію ранового процесу та часто носять суб'єктивний характер (Абаев Ю.К. Справочник хирурга: учебное пособие / Ю.К. Абаев - Ростов-н/Д: Феникс, 2007. - 427 с.).

Проведення ефективних лікувальних заходів в сучасних умовах є неможливим без комплексної оцінки структурного та функціонального стану імунної системи. Однак ці дослідження є досить коштовним та складними, а отримані результати дозволяють лише теоретично характеризувати той чи інший фактор резистентності чи імунологічної реактивності, які не завжди корелюють між собою та об'єктивно відображають реальні захисні можливості організму (Желіба М.Д. Профилактика та лікування післяопераційної ранової інфекції та гнійно-запальних захворювань м'яких тканин: дис. ... доктора медичних наук: 14.01.03 / Желіба Микола Дмитрович. - К., 2001. - 331 с.).

Стрімкий ріст комп'ютерних технологій відкриває широкі перспективи в галузі медицини, а саме автоматизації дослідження фіксованих препаратів крові з допомогою приладів, що здатні розпізнавати тонку структуру: клітин (Коробова Ф.В. Компьютерная морфометрия тромбоцитов / Ф.В. Коробова, Б.З. Соколинский, Г.И. Козинец // Клиническая лабораторная диагностика. - 1999. - № 10. - С. 22-23.). Серед діагностично значущих гематологічних показників в останні роки все більшої уваги набуває морфометрична характеристика нейтрофільних гранулоцитів - одних із головних клітин, які утримують першу лінію захисту від інфекції (Пинегин Б.В. Нейтрофилы: структура и функция / Б.В. Пинегин, А.Н. Маянский // Иммунология. - 2007. - № 6. - С. 374-383).

Перехід популяції нейтрофілів в активний стан супроводжується структурними змінами (зміна розмірів клітин, будова мембранного апарату та включення бактерицидних механізмів). Визначення функціонального стану та активності саме цих клітин має особливе значення для оцінки можливостей неспецифічних захисних механізмів макроорганізму, а отже діагностики та прогнозування перебігу патологічного процесу (Славинский, А.А. Компьютерный анализ изображения нейтрофильных лейкоцитов: щелочная фосфатаза // А.А. Славинский, Г.В. Никитина // Клиническая лабораторная диагностика. - 2002. - №1. - С. 40-43.).

Найбільш прийнятним за прототип є вивчення морфометричних критеріїв оцінки функціональної активності нейтрофільних гранулоцитів при рановому процесі шляхом світлооптичного (вимірювання площі та оптичної щільності клітин) та ультраструктурного (визначення периметру, площі клітин та площі первинних гранул по відношенню до площі стандартної масштабної сітки) дослідження цих клітин (Критерії оцінки стану системи нейтрофільних гранулоцитів крові у пацієнтів з рановою інфекцією / І.В. Гомоляко, К.П. Тумасова, Н.Є. Клочкова [та ін.] // Клінічна хірургія. - 2006. - № 11-12. - С. 54.).

Недоліком прототипу є недостатня інформативність визначення лише площі та оптичної щільності клітин, особливо для їх комплексної динамічної морфометричної характеристики, а проведення ультраструктурного аналізу потребує спеціальної підготовки матеріалу для дослідження та застосування електронного мікроскопу, що унеможлиблює широке використання запропонованих критеріїв у практичній діяльності.

Підвищити точність кількісної оцінки форми клітин можливо шляхом розрахунку інтегрального показника фактора форми, який окрім площі передбачає визначення периметру нейтрофільних гранулоцитів та їх співвідношення (Герасимов И.Г. Морфология нейтрофилов крови человекам прцессе их фагоцитоза in vitro / И.Г. Герасимов, Т.М. Гальбурт // Вісник Донецького національного університету, Сер. А: Природничі науки, 2009. - Вип. 1. - С. 377-382). При цьому встановлено, що при змінах функціональної активності нейтрофільних гранулоцитів змінюється фактор форми цих клітин (Новий комп'ютеризований спосіб визначення показань до адекватного призначення антибіотиків та імуномодуляторів / М.Ю. Ничитайло, Є.Б. Медвецький, А.А. Стасенко [та ін.] // Клінічна хірургія. - 2007. - № 5-6. - С. 75-76.). Однак вивчення закономірностей змін цього показника у хворих із рановим процесом досі не проводилось.

В основу винаходу "Спосіб діагностики перебігу ранового процесу" поставлено задачу розробити діагностичний критерій для діагностики перебігу ранового процесу на основі використання показника фактора форми нейтрофільних гранулоцитів (ФФНГ) при гнійній рані.

Поставлена задача вирішується визначенням показника ФФНГ в рановому вмісті хворих із гнійними ранами м'яких тканин. При цьому стабільне підвищення цього показника у рановому

вмісті вище рівня 0,89 вказує на перехід рани у фазу грануляції та сприятливий прогноз для подальшого загоєння ранового дефекту.

Спосіб здійснюється таким чином. Показник ФФНГ визначають в мазках ранового вмісту, що зафарбовані за Романовським-Гімзою. Для цього використовують мікроскоп, комп'ютерний аналізатор зображення та будь-яку комп'ютерну програму, що призначена для проведення морфометричного аналізу і має функціональний модуль для визначення показника фактора форми. При цьому досліджуються 10 нейтрофільних гранулоцитів у різних ділянках предметного скельця та розраховується середній показник їх фактора форми (морфометрична програма розраховує цей показник автоматично). У 30 здорових добровольців середній показник ФФНГ у крові склав $0,96 \pm 0,01$.

Було обстежено 53 хворих з гнійними ранами м'яких тканин, які перебували на стаціонарному лікуванні з приводу гострої гнійної патології м'яких тканин і підлягали оперативному втручанню з подальшою антибіотикотерапією та місцевим лікуванням післяопераційних ран із врахуванням фази ранового процесу. З метою динамічного контролю за перебігом гнійних ран проводили забір крові для вивчення лабораторних (встановлення кількості лейкоцитів, ШОЕ, підрахунок лейкоцитарної формули, розрахунок лейкоцитарного індексу інтоксикації (ЛІІ) за Я.Я. Кальф-Каліфом), імунологічних (визначення фагоцитарного показника (ФП), фагоцитарного індексу (ФІ), НСТ-спонтанного, НСТ-стимульованого) показників, ранового вмісту для цитологічного та бактеріологічного досліджень, які визначались традиційним способом. Для визначення показника ФФНГ використовували мазки крові та ранового вмісту, зафарбовані за Романовським-Гімзою, мікроскоп "МИКМЕД - 2" з MEDICAL IMAGE VIEW STATION і комп'ютерним аналізатором зображення UNHSCSA ImageTool v.3.0 та спеціальну програму, розроблену фірмою "Ева" (Україна), "Factor M"). Описані дослідження проводили на 1, 3, 5, 7 і 10 доби. Статистична обробка отриманих результатів була виконана з використанням програмного пакету "STATISTIGA 6.1.».

При госпіталізації показник ФФНГ у крові становив $0,8809 \pm 0,0009$. На 2 добу після госпіталізації та виконання оперативного втручання цей показник зростав до $0,8973 \pm 0,0009$, у рановому вмісті він становив $0,8682 \pm 0,0009$. Результатом подальшого визначення цього показника стало закономірне його зростання в обох досліджуваних рідинах. На 10 добу спостереження показник ФФНГ крові становив $0,9239 \pm 0,0010$, а ФФНГ ранового вмісту $0,8961 \pm 0,0008$. При цьому встановлено сильний прямий кореляційний зв'язок між цими показниками, визначеними у крові та рановому вмісті ($r=0,82$; ($p \leq 0,05$)).

Аналіз результатів рутинних лабораторних досліджень крові та розрахунку ЛІІ в динаміці встановили достовірну зміну цих показників лише на момент госпіталізації хворих, а саме: помірним лейкоцитозом ($9,67 \pm 0,33$ Г/л) підвищенням ШОЕ ($34,6 \pm 2,0$ мм/год.) і ЛІІ ($2,43 \pm 0,17$) та незначним збільшенням відносної кількості паличкоядерних нейтрофілів ($7,83 \pm 0,44$ %) з подальшим зниженням цих показників уже на другу добу та подальшою динамічною нормалізацією. Достовірної різниці змін в динаміці інших клітинних популяцій крові не визначалось.

При цьому встановлено зворотній кореляційний зв'язок між кількістю лейкоцитів у крові та показником ФФНГ, визначеним у крові ($r = -0,58$; ($p \leq 0,05$)) та рановому вмісті ($r = -0,52$; ($p \leq 0,05$)).

Проведене бактеріологічне дослідження ранового вмісту дозволило встановити, що основним збудником при якісній оцінці ранового вмісту був *S. aureus*. На першу добу кількість мікроорганізмів в рані становила $7,48 \pm 0,49$ log КУО/мл з подальшою тенденцією до зниження. Кореляційний аналіз дозволив встановити сильний зворотній кореляційний зв'язок кількості мікроорганізмів до показників ФФНГ крові та ранового вмісту ($r = -0,91$; ($p \leq 0,05$)) та ($r = -0,75$; ($p \leq 0,05$)) відповідно).

Вивчення результатів цитологічних та морфологічних змін в динаміці підтверджує закономірність і стадійність процесів, які відбуваються в рані і має чіткий кореляційний зв'язок із показниками ФФНГ, особливо визначеними саме у рановому вмісті (встановлено зворотній сильний кореляційний зв'язок між показником ФФНГ та кількістю нейтрофільних гранулоцитів ($r = -0,87$; ($p \leq 0,05$)), їх дегенеруючих форм ($r = -0,86$; ($p \leq 0,05$)); прямий сильний кореляційний зв'язок із кількістю макрофагів ($r=0,86$; ($p \leq 0,05$)) та фібробластів ($r=0,83$; ($p \leq 0,05$)).

Результати імунологічного дослідження підтвердили пригнічення фагоцитарної активності клітинної ланки імунітету пацієнтів на початку патологічного процесу (ФП - $38,33 \pm 1,07$ % та ФІ - $4,17 \pm 0,21$ од) з подальшою тенденцією до підвищення цих показників. Виключення становили показник НСТ спонтанного, який у цей період був підвищений і становив $14,17 \pm 0,59$ % та НСТ стимульований, який не змінювався протягом усього періоду спостереження. Кореляційний аналіз встановив прямий кореляційний зв'язок між показником ФФНГ, визначеним у крові, та ФП

($r=0,56$; ($p \leq 0,05$)); ΦI ($r=0,62$; ($p \leq 0,05$)); зворотній зв'язок з НСТ спонтанним ($r = -0,53$; ($p \leq 0,05$)).

Таким чином, у хворих з гнійними ранами м'яких тканин показник ФФНГ; особливо визначений у рановому вмісті є надійним діагностичним тестом, що об'єктивно відображає перебіг ранового процесу, не поступаючись при цьому існуючим діагностичним критеріям, а інколи навіть перевершуючи їх.

Приклад. Хворий С, 27 роки, медична карта стаціонарного хворого № 1021, госпіталізований у гнійно-септичне відділення МКЛ ШМД м. Вінниці 30.01.2014 року зі скаргами на інтенсивний біль в ділянці правої гомілки, підвищення температури до $38,0^{\circ}\text{C}$, загальну слабкість, ускладнену ходу. Зі слів хворого тиждень по тому отримав травму цієї ділянки. За медичною допомогою не звертався, лікувався самостійно. Стан прогресивно погіршувався, що змусило звернутись за медичною допомогою.

Об'єктивно: загальний стан середньої тяжкості, хворий збуджений. Шкіра чиста. Пульс 86 уд/хв, ритмічний, задовільного наповнення. Артеріальний тиск 120/80 мм. рт. ст. Частота дихання - 22 за хвилину. Температура тіла - $37,8^{\circ}\text{C}$.

Місцево: права гомілка збільшена в об'ємі за рахунок набряку, різко гіперемована. В середній третині по передній поверхні визначалися інфільтрат, болючий при пальпації, гіперемія шкіри, рановий дефект, прикритий некротичним струпом $2,0 \times 0,5$ см. Активні і пасивні рухи кінцівкою викликають інтенсивний біль. При пальпації в центрі інфільтрату відзначена флуктуація.

Результати загального аналізу крові: гемоглобін - 138 г/л, лейкоцитирп - $18,5 \times 10^9/\text{л}$ (е-1 %, п - 12 %, с - 67 %, л - 17 %, мон - 3 %), ШОЕ - 58 мм/год. ЛІІ-2,3.

Діагноз: Флегмона правої гомілки.

04.06.2013 року виконано оперативне втручання: Розкриття та дренування флегмони правої гомілки.

В післяопераційному періоді хворому проводились системна антибактеріальна терапія, місцеве лікування ран антисептиками та антимікробними мазями на гідрофільній основі залежно від фази перебігу ранового процесу.

Після проведеного лікування стан хворого покращився, біль зник на 5 добу, нормалізацію температури відзначено на 4 добу, некролізис - на 6 добу, припинення виділень з рани - на 8 добу, зникнення пері фокальної гіперемії - на 6 добу, зникнення інфільтрату та набряку - на 7 добу, поява грануляцій - на 8 добу, поява ознак епітелізації - на 9 добу.

На 10 добу з покращенням хворий був виписаний із стаціонару для подальшого амбулаторного лікування.

Рівень лейкоцитів на першу добу після операції - $10,2 \times 10^9/\text{л}$, на 3-ю добу - $7,8 \times 10^9/\text{л}$, на 5-ту добу - $7,5 \times 10^9/\text{л}$ на 7-му - $8,4 \times 10^9/\text{л}$, на 10-у - $7,2 \times 10^9/\text{л}$.

Рівень ЛІІ на другу добу спостереження становив 1,9, на 3-ю добу - 1,4, на 5-у - 1,8, на 7-у - 1,8, на 10-у - 1,2.

При бактеріологічному дослідженні ранового вмісту визначався *S. aureus*, кількість якого на першу добу становила 7,69 log КУО/мл, на 3-ю добу 4,69 log КУО/мл, на 5-у добу - 3,69 log КУО/мл; в подальшому мікрофлора в рані не виявлялась.

При цитологічному дослідженні на 2-у та 3-ю добу визначався деструктивний тип цитогам, на 7-у - запальний та на 10-у регенеративно-запальний тип.

Результатами дослідження природної неспецифічної клітинної ланки імунітету до проведення лікування були: ФП - 41 %, ΦI - 5 од., НСТ спонтанний - 13 %, НСТ стимульований - 38; на 3-у добу: ФП - 45 %, ΦI - 7 од., НСТ спонтанний - 11 %, НСТ стимульований - 42 %; на 7-у добу - ФП - 48 %, ΦI - 9 од., НСТ спонтанний - 10 %, НСТ стимульований - 45 %; на 10-у добу - ФП - 59 %, ΦI - 6 од., НСТ спонтанний - 9 %, НСТ стимульований - 39 %.

Показник ФФНГ крові при госпіталізації становив 0,8721, на другу добу - 0,8865, на третю добу - 0,9027, на сьому добу - 0,9164, на десяту - 0,9253.

У рановому вмісті показник ФФНГ на другу добу становив 0,8674, на третю добу - 0,8747, на сьому добу - 0,8853, на десяту добу - 0,8904.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Спосіб діагностики перебігу ранового процесу, що передбачає мікроскопічне морфометричне дослідження нейтрофільних гранулоцитів у мазках ранового вмісту хворих з гнійними ранами, який **відрізняється** тим, що при морфометричному аналізі цих клітин проводять визначення показника фактора форми нейтрофільних гранулоцитів і при рівні цього показника вище 0,89 діагностують перехід рани у фазу грануляції.

Комп'ютерна верстка О. Рябко

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601