



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) UA

(11) 92494

(13) U

(51) МПК

G01N 33/48 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2013 15371**

(22) Дата подання заявки: **27.12.2013**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **26.08.2014**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **26.08.2014, Бюл.№ 16**

(72) Винахідник(и):

**Шевченко Борис Федорович (UA),
Бабій Олександр Михайлович (UA),
Татарчук Оксана Михайлівна (UA),
Кудрявцева Валентина Євгенівна (UA),
Пролом Наталія Вікторівна (UA),
Челкан Віра Володимирівна (UA)**

(73) Власник(и):

**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА ІНСТИТУТ
ГАСТРОЕНТЕРОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ,
пр. Правди, 96, м. Дніпропетровськ, 49074
(UA)**

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ АКТИВНОСТІ ЗАПАЛЕННЯ ПРИ ХРОНІЧНОМУ ПАНКРЕАТИТІ

(57) Реферат:

Спосіб оцінки активності запалення при хронічному панкреатиті включає визначення рівня прозапального цитокіну ФНП- α та протизапального ІЛ-10 в сироватці крові пацієнтів з хронічним панкреатитом. Спочатку визначається рівень ПМН-еластази в калі. Потім розраховують коефіцієнт співвідношення ФНП- α /ІЛ-10. Після цього визначають числові діапазони для характеристики активності запалення при хронічному панкреатиті: при відсутності запалення рівень ПМН-еластази менше 62 нг/мл та ФНП- α /ІЛ-10 менше 1,1; при неактивному запаленні рівень ПМН-еластази - 62-100 нг/мл та ФНП- α /ІЛ-10 - 1,2 - 2,5; при активному запаленні рівень ПМН-еластази більше 100 нг/мл та ФНП- α /ІЛ-10 більше 2,6.

UA 92494 U

Корисна модель належить до медицини, а саме до внутрішніх хвороб, та може бути використана для об'єктивної оцінки активності запалення при хронічному панкреатиті (ХП).

Серед різноманітних механізмів пошкодження підшлункової залози (ПЗ) найбільш значимим патогенетичним фактором гострого та ХП є запалення. Згідно з більшістю сучасних наукових робіт, про- та протизапальні регуляторні цитокини виконують ключову роль в патогенезі гострого та хронічного панкреатитів. Одним із важливих механізмів патогенезу запалення ПЗ є дисбаланс між прозапальними та регуляторними цитокинами [1].

Клітинні механізми виникнення і перебігу панкреатиту включають активацію запалення за допомогою медіаторів нейтрофільних гранулоцитів і мононуклеарних макрофагів. Таких медіаторів (цитокінів) відомо більше 200, із них найбільший інтерес представляють фактор некрозу пухлин α (ФНП- α).

ФНП- α один з найбільш активних цитокінів, ключовий в процесі запалення. Його синтезують нейтрофіли, моноцити/макрофаги, Т-лімфоцити. У низьких концентраціях ФНП- α збільшує синтез адгезивних молекул на ендотеліальних клітинах, що дозволяє нейтрофілам прикріплюватися до стінок судин в місцях запалення. Активує респіраторний вибух у нейтрофілах, приводить до посилення кілінгової потенції фагоцитуючих клітин. Окрім цитотоксичної функції захисту проти клітин пухлин, він активує нейтрофіли, Т- і В-лімфоцити, моноцити, активує хемотаксис. Цей цитокін є важливим гуморальним фактором неспецифічної резистентності, відіграє регуляторну роль у функціонуванні захисних сил організму. У великих концентраціях ФНП- α є важливим медіатором, що призводить до розвитку ендотоксин-індукованого септичного шоку. Цитокини, такі як інтерлейкін - 10 (ІЛ-10), служать ефективними інгібіторами запалення [2, 3, 4].

Організм реагує запальною реакцією у відповідь на патогенну інвазію або пошкодження тканини в результаті хірургічного втручання. Поліморфноядерні гранулоцити відіграють важливу роль як клітини первинного захисту при запальних реакціях. Циркулюючі цитокини привертають поліморфноядерні нейтрофіли (ПМН) та стимулюють їх фагоцитарну функцію. ПМН використовують протеїнази для руйнування патогенів. Одна із цих протеїназ - еластаза ПМН.

Інтерес до еластаз, який спостерігається в наш час, пояснюється, перш за все, їх активною участю у розвитку захворювань запального ґенезу та високою клініко-діагностичною інформативністю визначення цих протеїназ при багатьох патологічних процесах. Відома особа діагностична та прогностична цінність визначення еластаз при гострому та хронічному панкреатитах. Це пояснюється в суттєвому ступені високою катаболічною активністю еластаз та широким спектром білків, які піддаються протеолізу та втрачають свої біологічні властивості під дією цих ферментів. Є підстави вважати, що еластази виходять на рівень нових маркерів, а в ряді випадків і "золотим стандартом" при визначенні гострого та/або хронічного запалення різної етіології [5, 6].

Які найближчий аналог [7] розглядається роль фактора некрозу пухлин, ІЛ-4, ІЛ-10 у розвитку та прогресуванні запалення хворих на ХП, який полягає в тому, що у сироватці крові відносно здорових осіб та пацієнтів з алкогольною та рецидивуючою формами ХП визначають рівень ІЛ-4, ІЛ-10 та ФНП- α , а ІЛ-10 додатково і в культуральній рідині. Показано, що у хворих з ХП алкогольної етіології через добу після загострення встановлена висока концентрація ФНП- α та ІЛ-4, а в культуральній рідині (але не в сироватці крові) - ІЛ-10 із швидким зниженням на 6 добу загострення. У хворих з рецидивуючим ХП встановлено відстрочений синтез цитокінів: на 6 добу загострення вміст ФНП- α перевищував показники контрольної групи. Інтенсивний викид ІЛ-4, який корелював із тяжкістю процесу, відмічався на 6 добу лише у пацієнтів з загостренням ХП. В період ремісії у цих хворих, при наявності біліарно-панкреатичної регургітації, рівень ФНП- α був більше в 14 разів, ніж у хворих без регургітації. Вважають, що біліарно-панкреатичний рефлюкс провокує високу активність запальних процесів. У хворих з ХП відмічається дисбаланс цитокінів ІЛ-4 та ІЛ-10, ФНП- α .

Спосіб визначення активності запалення при ХП, що заявляється, має ряд переваг перед найближчим аналогом (визначається рівень ПМН-еластази, ФНП- α , ІЛ-10, розраховується коефіцієнт співвідношення ФНП- α /ІЛ-10; визначаються числові діапазони розрахованих показників для характеристики активності запалення при ХП) і може успішно застосовуватися в гастроентерології, особливо у пацієнтів в фазі загострення ХП.

В основу корисної моделі поставлена задача розробки такого способу діагностики, який дозволив би визначити активність запалення у пацієнтів з ХП, що вплине на підвищення ефективності лікувальної тактики та прискорить видужання пацієнтів.

Поставлена задача вирішується тим, що визначають в сироватці крові практично здорових осіб (контрольна група) та хворих на ХП ПМН-еластази, ФНП- α , ІЛ-10 і розрахунку коефіцієнта співвідношення ФНП- α /ІЛ-10.

У групи пацієнтів без ознак запалення рівень ПМН-еластази менше 62 нг/мл, ФНП- α дорівнює $(8,58 \pm 2,56)$ пг/мл, ІЛ-10 відповідає значенню $(11,38 \pm 1,68)$ пг/мл та коефіцієнт співвідношення ФНП- α /ІЛ-10 дорівнює $(0,8 \pm 0,22)$ (інтервал менше 1,1).

У групи пацієнтів з неактивним запаленням рівень ПМН-еластази $(77,5 \pm 3,23)$ нг/мл (інтервал від 62 нг/мл до 100 нг/мл), ФНП- α дорівнює $(20,74 \pm 5,28)$ пг/мл, ІЛ-10 відповідає значенню $(10,08 \pm 0,98)$ пг/мл та коефіцієнт співвідношення ФНП- α /ІЛ-10 дорівнює $(2,28 \pm 0,27)$ (інтервал від 1,2 до 2,5).

При активному запаленні рівень ПМН-еластази $(380,0 \pm 126,64)$ нг/мл (інтервал більше 100 нг/мл), ФНП- α дорівнює $(34,03 \pm 4,2)$ пг/мл, ІЛ-10 відповідає значенню $(11,2 \pm 1,04)$ пг/мл та коефіцієнт співвідношення ФНП- α /ІЛ-10 дорівнює $(3,1 \pm 0,29)$ (інтервал більше 2,6), (Табл. 1).

Порівняльний аналіз заявленої корисної моделі та найближчого аналога дозволяє встановити, що вони мають ряд загальних ознак:

1. Визначення імунологічних показників здійснюється в сироватці крові хворих на ХП.

2. Визначення рівня прозапального цитокіну ФНП- α та протизапального ІЛ-10.

Заявлений спосіб має наступні відмінності від найближчого аналога:

1. Визначається рівень ПМН-еластази в калі.

2. Розраховують коефіцієнт співвідношення ФНП- α /ІЛ-10.

3. Визначають числові діапазони для характеристики активності запалення при ХП.

Таким чином, заявлений спосіб має суттєві відмінні ознаки у порівнянні з найближчим аналогом, які разом із вже відомими, дозволять досягнути технічного результату: отримати інформацію про активність запалення при ХП на основі значень та числових діапазонів відповідних показників і попередити при цьому побічні ефекти та ускладнення, підвищити діагностичне значення результатів дослідження, як наслідок, вирішити задачу корисної моделі.

Оцінка кількісних характеристик результатів дослідження базується на даних, отриманих авторами при вивченні імунологічних показників у 10 здорових осіб, які склали контрольну групу та 14 пацієнтів з ознаками запалення різної активності: без ознак запалення ($n=5$), неактивне запалення ($n=5$), активне запалення ($n=4$). Результати досліджень представлені в таблиці.

Спосіб здійснюють наступним чином: у пацієнта вранці о 9 годині натщесерце проводиться забір 5 мл крові з ліктьової вени і в сироватці крові визначається рівень ФНП- α та ІЛ-10, розраховується коефіцієнт співвідношення ФНП- α /ІЛ-10. Визначається рівень ПМН-еластази в калі. По числовим інтервалам значень ПМН-еластази та коефіцієнта співвідношення встановлюється ступінь активності запалення при ХП. Кількісний рівень ПМН-еластази в калі визначається за допомогою імуноферментного аналізу [тест-набори фірми "Immundiagnostik"]. Визначення концентрації ФНП- α та ІЛ-10 в сироватці крові проводили імуноферментним методом [тест набори фірми ЗАО "Вектор-бест" (м. Новосибірськ)].

Статистичні методи аналізу.

Визначаємо рівень ПМН-еластази, ФНП- α та ІЛ-10.

Потім розраховуємо коефіцієнт співвідношення ФНП- α /ІЛ-10.

Дослідженнями встановлено, що у групи пацієнтів без ознак запалення рівень ПМН-еластази дорівнював $(28,0 \pm 6,82)$ нг/мл (інтервал менше 62 нг/мл) та коефіцієнт співвідношення ФНП- α /ІЛ-10 складав $(0,8 \pm 0,22)$ (інтервал менше 1,1).

У групи пацієнтів з неактивним запаленням рівень ПМН-еластази дорівнював $(77,5 \pm 3,23)$ нг/мл (інтервал від 62 нг/мл до 100 нг/мл) та коефіцієнт співвідношення ФНП- α /ІЛ-10 складав $(2,28 \pm 0,27)$ (інтервал від 1,2 до 2,5).

У групи пацієнтів з активним запаленням рівень ПМН-еластази дорівнював $(380,0 \pm 126,64)$ нг/мл (інтервал більше 100 нг/мл) та коефіцієнт співвідношення ФНП- α /ІЛ-10 складав $(3,1 \pm 0,29)$ (інтервал більше 2,6), (Табл.1).

Запропонований спосіб ілюструється наступними прикладами.

Приклад 1. Дослідження проведено здоровому добровольцю А., 36 років, вагою тіла 78 кг, який не скаржився на стан здоров'я та не мав гастроентерологічної патології в минулому з метою визначення параметрів норми в контрольній групі. Вранці натщесерце проведено забір 15 мл крові із ліктьової вени. Визначався рівень ПМН-еластази, ФНП- α , ІЛ-10 розраховувався коефіцієнт співвідношення ФНП- α /ІЛ-10.

Встановлено, що рівень ПМН-еластази дорівнював 53,2 нг/мл, ФНП- α 7,5 пг/мл, ІЛ-10 10,8 пг/мл та коефіцієнт співвідношення ФНП- α /ІЛ-10 складав 0,7, що відповідало нормі.

Запропонований спосіб у здорового добровольця свідчив про відсутність запалення в ПЗ.

Приклад 2. У пацієнта К., 36 років, вага тіла 75 кг, історія хвороби № 216, який госпіталізований у клініку ДУ "Інститут гастроентерології НАМН України" 20.01.2011 року з основним діагнозом: Постнекротична кіста тіла ПЗ.

Вранці натщесерце проведено забір 5 мл крові із ліктьової вени. Визначався рівень ПМН-еластази, ФНП- α , ІЛ-10 розраховувався коефіцієнт співвідношення ФНП- α /ІЛ-10.

Встановлено, що рівень ПМН-еластази дорівнював 20,0 нг/мл, ФНП- α -0,6 пг/мл, ІЛ-10-14,2 пг/мл та коефіцієнт співвідношення ФНП- α /ІЛ-10 складав 0,04, що свідчило за відсутність ознак запалення ПЗ.

Операція 27.01.2011 року - зовнішнє дренування кісти ПЗ під УЗ-контролем.

Таким чином, у даному випадку діагностовано відсутність ознак запалення в ПЗ, тому було планово виконано оперативне втручання.

Приклад 3. У пацієнта Б., 52 років, вага тіла 97 кг, історія хвороби № 3280, який госпіталізований у клініку ДУ "Інститут гастроентерології НАМН України" 27.10.2011 року з основним діагнозом: Постнекротична кіста тіла ПЗ. Хронічний панкреатит у стадії нестійкої ремісії (в анамнезі - лапароскопія, дренування черевної порожнини з приводу гострого панкреатиту (10.05.2010 р.).

Вранці натщесерце проведено забір 5 мл крові із ліктьової вени. Визначався рівень ПМН-еластази, ФНП- α , ІЛ-10 та розраховувався коефіцієнт співвідношення ФНП- α /ІЛ-10.

Встановлено, що рівень ПМН-еластази дорівнював 75,0 нг/мл, ФНП- α -15,6 пг/мл, ІЛ-10-6,8 пг/мл та коефіцієнт співвідношення ФНП- α /ІЛ-10 складав 2,3, що було характерно для неактивного запалення.

Операція від 02.11.2011 року - зовнішнє дренування кісти тіла ПЗ під УЗ-контролем.

В післяопераційному періоді проводили контроль залишкової порожнини (УЗД, фістулографія). 16.12.11 - дренаж видалено, 20.12.11 - при контрольному УЗД кісти ПЗ не визначалося. Виписаний для подальшого клінічного та сонографічного динамічного нагляду.

Таким чином, у даному випадку мало місце неактивне запалення в ПЗ, тому було виконано оперативне втручання без попередньої протизапальної консервативної терапії та мало у віддаленому періоді позитивний результат.

Приклад 4. У пацієнта К., 35 років, вага тіла 64 кг, історія хвороби № 3054, який госпіталізований у клініку ДУ "Інститут гастроентерології НАМН України" 10.10.2011 року основний діагноз: Хронічний панкреатит, стадія загострення, ускладнений вірсунгодилатацією та холестазом.

Вранці натщесерце проведено забір 5 мл крові із ліктьової вени. Визначався рівень ПМН-еластази, ФНП- α , ІЛ-10 розраховувався коефіцієнт співвідношення ФНП- α /ІЛ-10.

Встановлено, що рівень ПМН-еластази дорівнював 230,0 нг/мл, ФНП- α - 41,5 пг/мл, ІЛ-10-10,5 пг/мл та коефіцієнт співвідношення ФНП- α /ІЛ-10 складав 3,9, що було характерно для активного запалення.

В доопераційному періоді хворому було проведено консервативну протизапальну терапію: глюкозо-сольові розчини, антибіотикотерапія, імунomodуюча терапія, дексалгін, ренальган, гепатопротектори, інгібітори протонної помпи, інгібітори протеаз, L-лізину есцинат, актовегін, прокінетики (метоклопрамід), ферменти (креон).

Через 14 діб після проведення протизапальної терапії виконано лабораторний контроль. Так, рівень ПМН-еластази дорівнював 66,3 нг/мл, ФНП- α - 11,4 пг/мл, ІЛ-10-8,2 пг/мл та коефіцієнт співвідношення ФНП- α /ІЛ-10 складав 1,4, що вже було характерним для неактивного запалення.

Операція 28.10.2011 року - інтрапаренхіматозна резекція голівки ПЗ за Фреєм з продольною панкреатоеюностомією на виключеній за Ру петлі тонкої кишки, холецистоеюностомія. Біопсія ПЗ. Дренування черевної порожнини та сальникової сумки. Післяопераційний період перебігав без ускладнень, шви зняті на 8 добу.

Таким чином, у даному випадку мало місце активне запалення в ПЗ, що потребувало проведення курсу протизапальної терапії з послідовним лабораторним контролем, за даними якого встановлено купування активності запалення, після чого було проведено оперативне втручання без інтра- та післяопераційних ускладнень.

Заявлений спосіб, який застосований у відділі хірургії органів травлення ДУ "Інститут гастроентерології НАМН України" у 14 пацієнтів дозволив встановити, що у групи пацієнтів без ознак запалення рівень ПМН-еластази дорівнював $(28,0 \pm 6,82)$ нг/мл та коефіцієнт співвідношення ФНП- α /ІЛ-10 складав $(0,8 \pm 0,22)$; у групи пацієнтів з неактивним запаленням рівень ПМН-еластази дорівнював $(77,5 \pm 3,23)$ нг/мл та коефіцієнт співвідношення ФНП- α /ІЛ-10 складав $(2,28 \pm 0,27)$; при активному запаленні рівень ПМН-еластази дорівнював $(380,0 \pm 426,64)$ нг/мл та коефіцієнт співвідношення ФНП- α /ІЛ-10 складав $(3,1 \pm 0,29)$.

Отримані результати дозволили визначити числові інтервали для характеристики активності запалення при ХП: без ознак запалення рівень ПМН-еластази менше 62 нг/мл та коефіцієнт співвідношення ФНП- α /ІЛ-10 менше 1,1; у пацієнтів з неактивним запаленням в ПЗ рівень ПМН-

еластази - від 62 нг/мл до 100 нг/мл та коефіцієнт співвідношення ФНП- α /ІЛ-10 - від 1,2 до 2,5; при активному запаленні в ПЗ рівень ПМН-еластази більше 100 нг/мл та коефіцієнт співвідношення ФНП- α /ІЛ-10 більше 2,6.

Таблиця

Рівень ПМН-еластази у калі, цитокінів в сироватці крові та коефіцієнт ФНП- α /ІЛ-10 при хронічному панкреатиті

Показник	Контрольна група (n=10)	Хворі на ХП без ознак запалення (n=5)	Хворі на ХП з неактивним запаленням (n=5)	Хворі на ХП з активним запаленням (n=4)
ПМН-еластаза, нг/мл	<62	28,0 \pm 6,82	77,5 \pm 3,23#	380,0 \pm 126,64***
ФНП- α , пг/мл	2,20 \pm 0,81	8,58 \pm 2,56*	20,74 \pm 5,28#	34,03 \pm 4,2**
ІЛ-10, пг/мл	28,6 \pm 1,83	11,38 \pm 1,68*	10,08 \pm 0,98*	11,2 \pm 1,04*
ФНП- α /ІЛ-10	0,08 \pm 0,02	0,8 \pm 0,22*	2,28 \pm 0,27*#	3,1 \pm 0,29**

Примітки:

1. * - (p<0,01), ** - (p<0,05) достовірність відмінностей між групою пацієнтів без запалення та з активним запаленням;
2. # - (p<0,05) - достовірність відмінностей між групою пацієнтів без запалення та з неактивним запаленням;
3. + - (p<0,05) - достовірність відмінностей між групами пацієнтів з неактивним та з активним запаленням.
4. * - (p<0,05) - достовірність відмінностей між групою контролю та групами хворих на ХП.

5

Застосування заявленого способу в умовах клініки підтвердило його працездатність та можливість застосування у лікувальній практиці медичних установ. Даний спосіб дозволяє встановити активність запалення в

ПЗ у хворих на ХП, що підвищує ефективність діагностики і зменшує кількість інтра- та післяопераційних ускладнень в плановому хірургічному лікуванні.

10

Джерела інформації: 1. Особенности цитокиновой реактивности при остром и хроническом панкреатите / М.В. Клименко // Украинский журнал хирургии. - 2013. - №2 (21). - С. 16-24.

2. Пасиешвили Л. М. Состояние и роль цитокинового звена иммунитета в становлении и прогрессировании заболеваний пищеварительного канала / Л. М. Пасиешвили, М. В. Моргулис // Сучасна гастроентерологія. - 2004. - № 3. - С. 8-11.

15

3. Фрейдлин И. С. Паракринные и аутокринные механизмы цитокиновой иммунорегуляции / И.С. Фрейдлин // Иммунология. - 2001. - №5. - С.4-7.

4. Царегородцева Т. М. Цитокины в гастроэнтерологии / Т. М. Царегородцева, Т.И. Серова // М.: "Анахарсис". - 2003. - 96 с.

20

5. Яровая Г.А. Свойства и клинко-диагностическое значение определения эластазы из панкреатической железы и полиморфноядерных лейкоцитов / Г.А. Яровая // Лабораторная медицина. - 2008. - № 6. - С. 34-41.

6. Uhl W., Buchler M, Malfertheiner P., Martini M., Beger H.G. PMN-elastase in comparison with CRP, antiproteases and LDH as indicators of necrosis in human acute pancreatitis. Pancreas.- 1991; №6: 253-259.

25

7. Роль фактора некроза опухоли, интерлейкинов 4 и 10 в развитии и прогрессировании воспаления у больных хроническим панкреатитом / Долгих Т.И., Ширинская Н.В., Гордиенко Н.Г., Соколова Т.Ф. // Цитокины и воспаления. - 2003. - Т. 2, № 4. - С. 40-43.

30

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб оцінки активності запалення при хронічному панкреатиті, що включає визначення рівня прозапального цитокіну ФНП- α та протизапального ІЛ-10 в сироватці крові пацієнтів з хронічним панкреатитом, який **відрізняється** тим, що спочатку визначається рівень ПМН-еластази в калі, потім розраховують коефіцієнт співвідношення ФНП- α /ІЛ-10, після чого визначають числові діапазони для характеристики активності запалення при хронічному панкреатиті: при відсутності запалення рівень ПМН-еластази менше 62 нг/мл та ФНП- α /ІЛ-10 менше 1,1; при неактивному запаленні рівень ПМН-еластази - 62-100 нг/мл та ФНП- α /ІЛ-10 - 1,2-2,5; при активному запаленні рівень ПМН-еластази більше 100 нг/мл та ФНП- α /ІЛ-10 більше 2,6.

35

Комп'ютерна верстка І. Мироненко

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

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