

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(12)

РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ



НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ
СОБСТВЕННОСТИ

(19) **ВУ** (11) **8760**

(13) **С1**

(46) **2006.12.30**

(51)⁷ **G 01N 33/48**

(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТИПА СИСТЕМНОЙ РЕАКЦИИ ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА

(21) Номер заявки: а 20030763

(22) 2003.07.24

(43) 2005.03.30

(71) Заявитель: Учреждение образования
"Гродненский государственный ме-
дицинский университет" (ВУ)

(72) Авторы: Смотрин Сергей Михайло-
вич; Наумов Игорь Алексеевич; Ост-
ровский Александр Александрович;
Шейбак Владимир Михайлович; Го-
ловко Елена Викторовна (ВУ)

(73) Патентообладатель: Учреждение обра-
зования "Гродненский государствен-
ный медицинский университет" (ВУ)

(56) SOUTHAM C.M. et al. Blood. The Jour-
nal of Hematology, 1966, v. XXVII, No 5,
p. 734-739.

SU 1629848 A1, 1991.

RU 2126153 C1, 1999.

KENNEY R.T. et al. J.Immunol Methods,
1987, v. 97, No 1, p. 101-110.

(57)

Способ определения типа системной реакции организма здорового человека, заключающийся в том, что на предплечье пациента создают кожно-вакуумные пузыри, из которых через 6 часов и через 24 часа отбирают жидкость и подсчитывают в 1 мм³ абсолютное количество лейкоцитов, содержание нейтрофилов, макрофагов, лимфоцитов, Т-лимфоцитов, Т-хелперов CD4, Т-супрессоров CD8, по отношению CD4/CD8 рассчитывают иммунорегуляторный индекс, и при изменении количества лейкоцитов с 1670-2120 до 2410-3540, содержания нейтрофилов с $67,6 \pm 3,5 \%$ до $55,2 \pm 4,4 \%$, макрофагов с $27,3 \pm 3,2 \%$ до $39,9 \pm 3,9 \%$, лимфоцитов с $1,96 \pm 0,4 \%$ до $3,0 \pm 0,7 \%$, Т-лимфоцитов с $49,4 \pm 2,6 \%$ до $59,3 \pm 1,9 \%$ и значениях иммунорегуляторного индекса 1,1-1,3 тип системной реакции организма определяют как нормоэргический, при изменении количества лейкоцитов с 970-1420 до 980-1870, содержания нейтрофилов с $52,9 \pm 5,1 \%$ до $31,2 \pm 3,1 \%$, макрофагов с $44,7 \pm 2,8 \%$ до $65,3 \pm 3,8 \%$, лимфоцитов с $1,74 \pm 0,32 \%$ до $1,13 \pm 0,64 \%$, Т-лимфоцитов с $46,3 \pm 1,9 \%$ до $48,2 \pm 2,7 \%$ и значениях иммунорегуляторного индекса 0,8-0,9 тип системной реакции организма определяют как гиперэргический, а при изменении количества лейкоцитов с 2140-2570 до 3610-3990, содержания нейтрофилов с $77,4 \pm 1,6 \%$ до $70,3 \pm 2,2 \%$, макрофагов с $20,4 \pm 1,4 \%$ до $25,4 \pm 2,1 \%$, лимфоцитов с $2,43 \pm 0,21 \%$ до $3,11 \pm 0,53 \%$, Т-лимфоцитов с $44,4 \pm 2,1 \%$ до $45,8 \pm 1,8 \%$ и значениях иммунорегуляторного индекса 1,5-1,7 тип системной реакции организма определяют как гиперэргический.

Изобретение относится к области медицины, а именно к клинической лабораторной диагностике, и может использоваться для определения типа системной реакции организма человека на внешнее воздействие.

Проблема создания технически простого и диагностически значимого способа, позволяющего оценивать системную реакцию организма на внешнее воздействие и на его осно-

ве прогнозировать течение патологического процесса, является одной из важнейших в медицинской практике.

Известны аналоги для оценки системной реакции организма на внешнее воздействие - методы "кожного окна" и "раневого отпечатка".

Способ "кожного окна" [Rebuck J.W., Crowley J.H. A method studying leukocytes functions "in vivo"//Ann. N.Y. Acad. Sci. 1955, No 59, p. 757.] заключается в нанесении скарификационной раны площадью 0,2-0,5 см² на коже передней поверхности предплечья. Ранку, лишенную эпидермиса, покрывают стерильным стеклом. Периодически стекла заменяют. Полученные отпечатки окрашивают по Романовскому. Препараты просматривают под микроскопом с иммерсией, подсчитывая не менее 200-300 клеток.

Недостатком способа "кожного окна" является его техническая сложность, невысокая стандартность в нанесении травмы (при скарификации невозможно отделение одного лишь эпидермиса от дермы ввиду извилистого хода базальной мембраны), значительная болезненность при нанесении скарификационной травмы и при получении препаратов-отпечатков, затруднение в поддержании асептичности (в препаратах обнаруживаются микробы); затрудненная интерпретация результатов (большинство данных получено в экспериментах на животных), невозможность оценки абсолютных параметров воспалительной эмиграции (оценивается лишь удельный вес тех или иных клеток на покровном стекле).

Способ "раневого отпечатка" [Покровская М.П., Макаров М.С. Цитология раневого экссудата как показатель процесса заживления ран. - М.: Медгиз, 1942 г., с. 42] заключается в получении препаратов-отпечатков из верхнего лейкоцитарного слоя раны после предварительного снятия гноя с ее поверхности. Препараты окрашиваются по Романовскому. При просмотре под микроскопом определяется относительное содержание клеточных элементов в зависимости от однородности клеточного состава.

Недостатками способа "раневого отпечатка" являются техническая сложность, затруднена стандартность при получении препарата-отпечатка (невозможно полноценное отделение гнойного слоя), затруднена интерпретация результатов (в препарат-отпечаток попадают элементы из верхних слоев раны - лейкоцитарного и сосудистого, избыточные недифференцированными элементами соединительной ткани, представление о характере процесса возможно только при последовательном сопоставлении цитологических данных), невозможность оценки абсолютных параметров воспалительной эмиграции (оценивается лишь удельный вес тех или иных клеток на покровном стекле).

Известен способ кожных камер [Southam C.M., Levin A.G. A quantitative Rebuck technique//Blood. 1966, vol. 27, p. 734-738], заключающийся в том, что для изучения системной реакции организма на внешнее воздействие после скарификации кожи используют специальные камеры, заполняемые стерильными растворами с различными хемоаттрактантами. Периодически из полости камер производят забор жидкости лишь для однократного подсчета только абсолютного количества лейкоцитов в камере Горяева и после окраски по Романовскому для определения относительного содержания различных форм лейкоцитов, подсчитывая не менее 200-300 клеток.

Недостатками способа являются техническая сложность, невысокая стандартность в нанесении травмы, значительная болезненность при нанесении скарификационной травмы и при получении клеточных проб, затруднение в поддержании асептичности, неадекватная смена клеточных фаз при развитии асептического воспаления, низкая диагностическая ценность способа в оценке системной реакции организма.

Задача изобретения - разработать малотравматичный способ, позволяющий определять тип системной реакции организма человека с высокой диагностической точностью и стандартностью.

Поставленная задача решается путем создания на предплечье пациента кожно-вакуумных пузырей, из которых через 6 часов и через 24 часа отбирают жидкость и подсчитывают в 1 мм^3 абсолютное количество лейкоцитов, содержание нейтрофилов, макрофагов, лимфоцитов, Т-лимфоцитов, Т-хелперов (CD4), Т-супрессоров (CD8), рассчитывают иммунорегуляторный индекс (CD4/CD8), составляют иммунограмму, и в случае увеличения абсолютного количества лейкоцитов с 1670-2120 до 2410-3540, количества макрофагов от $27,3 \pm 3,2 \%$ до $39,9 \pm 3,9 \%$, лимфоцитов от $1,96 \pm 0,4 \%$ до $3,0 \pm 0,7 \%$, Т-лимфоцитов от $49,4 \pm 2,6 \%$ до $59,3 \pm 1,9 \%$, уменьшения количества нейтрофилов от $67,6 \pm 3,5 \%$ до $55,2 \pm 4,4 \%$, при этом иммунорегуляторный индекс составляет 1,1-1,3, определяют нормоэргический тип системной реакции, в случае увеличения абсолютного числа лейкоцитов с 970-1420 до 980-1870, количества макрофагов от $44,7 \pm 2,8 \%$ до $65,3 \pm 3,8 \%$, Т-лимфоцитов от $46,3 \pm 1,9 \%$ до $48,2 \pm 2,7 \%$, уменьшения количества нейтрофилов от $52,9 \pm 5,1 \%$ до $31,2 \pm 3,1 \%$, лимфоцитов от $1,74 \pm 0,32 \%$ до $1,13 \pm 0,64 \%$, снижения иммунорегуляторного индекса до 0,8-0,9 определяют гиперэргический тип системной реакции, в случае увеличения абсолютного числа лейкоцитов от 2140-2570 до 3610-3990, количества макрофагов от $20,4 \pm 1,4 \%$ до $25,4 \pm 2,1 \%$, лимфоцитов от $2,43 \pm 0,21 \%$ до $3,11 \pm 0,53 \%$, Т-лимфоцитов от $44,4 \pm 2,1 \%$ до $45,8 \pm 1,8 \%$, уменьшения количества нейтрофилов от $77,4 \pm 1,6 \%$ до $70,3 \pm 2,2 \%$, увеличения иммунорегуляторного индекса до 1,5-1,7 определяют гиперэргический тип системной реакции организма.

Способ осуществляют следующим образом. На коже внутренней поверхности средней трети левого плеча или предплечья человека с помощью отсасывателя медицинского наносят вакуумную микротравму. При этом при помощи специальных камер образуют кожно-вакуумные пузыри. После предварительной обработки кожи 70 %-ным этиловым спиртом понижают давление до $-0,6 \text{ кг/см}^2$ и поддерживают его в течение 30-45 минут до образования 4-8 пузырей диаметром 4,5-5,5 мм (их объем составляет 20-40 мкл). Жидкость из пузырей берут через 6 и 24 часа от начала воздействия отрицательного давления. Для сохранения пузырей неповрежденными в течение указанных промежутков времени на участок кожи, подвергшийся воздействию неполного вакуума, помещают марлевый тампон, который фиксируют с помощью полосок лейкопластыря. Первую часть забранной из полости кожно-вакуумных пузырей жидкости используют для подсчета абсолютного количества лейкоцитов (применяют камеру Горяева). Вторую часть пузырьной жидкости помещают на предметное стекло. В ней после окраски по Романовскому определяют относительное содержание различных форм лейкоцитов, подсчитывая не менее 200-300 клеток. Третью часть забранной жидкости используют для иммунофенотипирования лимфоцитов с использованием диагностикумов на основе моноклональных антител. Определяют Т-лимфоциты, Т-хелперы (CD4) и Т-супрессоры (CD8). Затем определяют иммунорегуляторный индекс как отношение CD4 к CD8. Анализы проводят через 6 и 24 часа после нанесения микротравмы, т.е. наблюдают за развитием процесса в динамике, и по полученным иммунограммам судят о типе системной реакции организма на внешнее воздействие.

Нами изучены иммунограммы, полученные данным способом, у 75 здоровых лиц мужского и женского пола. Возраст обследованных составил 18-22 лет. Забор материала производили через 3, 6, 12 и 24 часа. Анализ материала показал, что у здоровых лиц в зависимости от индивидуальных особенностей реактивности организма наблюдаются 3 возможных типа системной реакции организма на внешнее воздействие - нормоэргический, гиперэргический и гиперэргический. Иммунограммы, характерные для каждого из этих типов, представлены в табл. 1, 2, 3.

Таблица 1

Иммунограмма нормоэргического типа

Показатели иммунограммы	3 часа	6 часов	12 часов	24 часа
Абсолютное количество лейкоцитов в 1 мм ³	420-560	1670-2120	2990-3930	2410-3540
Нейтрофилы, %	86,1±1,4	67,6±3,5	61,3±2,5	55,2±4,4
Макрофаги, %	9,99±1,4	27,3±3,2	32,9±2,4	39,9±3,9
Лимфоциты, %	1,49±0,30	1,96±0,40	2,42±0,50	3,00±0,70
Т-лимфоциты, %	47,8±2,3	49,4±2,6	52,6±2,9	59,3±1,9
Т-хелперы (CD4), %	32,2±2,1	31,6±2,1	31,7±1,9	31,9±1,8
Т-супрессоры (CD8), %	28,4±3,9	26,6±4,6	24,8±4,6	26,5±3,4
Иммунорегуляторный индекс (CD4/CD8)	1,1-1,2	1,1-1,2	1,1-1,3	1,1-1,3

Таблица 2

Иммунограмма гиперэргического типа

Показатели иммунограммы	3 часа	6 часов	12 часов	24 часа
Абсолютное количество лейкоцитов в 1 мм ³	220-340	970-1420	1840-2650	980-1870
Нейтрофилы, %	72,1±1,6	52,9±5,1	41,7±2,7	31,2±3,1
Макрофаги, %	15,9±1,5	44,7±2,8	55,8±1,4	65,3±3,8
Лимфоциты, %	1,31±0,11	1,74±0,32	1,13±0,35	1,13±0,64
Т-лимфоциты, %	47,8±3,1	46,3±1,9	48,7±2,1	48,2±2,7
Т-хелперы (CD4), %	26,1±1,1	26,4±2,2	25,5±1,8	26,8±2,1
Т-супрессоры (CD8), %	30,1±1,8	30,6±2,6	27,8±1,6	29,5±2,3
Иммунорегуляторный индекс (CD4/CD8)	0,8-0,9	0,8-0,9	0,8-0,9	0,8-0,9

Таблица 3

Иммунограмма гиперэргического типа

Показатели иммунограммы	3 часа	6 часов	12 часов	24 часа
Абсолютное количество лейкоцитов в 1 мм ³	610-860	2140-2570	3990-4880	3610-3990
Нейтрофилы, %	80,2±1,1	77,4±1,6	72,5±1,9	70,3±2,2
Макрофаги, %	19,3±0,33	20,4±1,4	21,8±1,8	25,4±2,1
Лимфоциты, %	2,11±0,11	2,43±0,21	3,23±0,19	3,11±0,53
Т-лимфоциты, %	45,3±1,4	44,4±2,1	46,5±2,8	45,8±1,8
Т-хелперы (CD4), %	36,3±3,3	37,2±2,3	34,7±3,9	35,7±1,8
Т-супрессоры (CD8), %	21,3±1,8	22,5±2,7	20,6±1,9	20,5±1,3
Иммунорегуляторный индекс (CD4/CD 8)	1,5-1,7	1,5-1,7	1,5-1,7	1,5-1,7

Из таблиц видно, что для иммунограммы нормоэргического типа характерно значительное устойчивое преобладание нейтрофильной эмиграции в пузырную жидкость с постепенным на протяжении суток нарастанием моноцитарной эмиграции лейкоцитов, иммунорегуляторный индекс на протяжении суток составляет 1,1-1,3.

Иммунограмма гиперэргического типа характеризуется устойчивой динамикой в течение суток нарастания моноцитарной эмиграции в пузырную жидкость с перекрестом меж-

ду 6 и 12 часами исследования, снижением удельного веса Т-хелперов и увеличением удельного веса Т-супрессоров, снижением иммунорегуляторного индекса до 0,8-0,9.

Для иммунограммы гиперергического типа характерны незначительная в течение суток динамика нейтрофильной и моноцитарной эмиграции в пузырную жидкость, увеличение удельного веса Т-хелперов и уменьшение удельного веса Т-супрессоров, увеличение иммунорегуляторного индекса до 1,5-1,7.

Кроме того, из таблиц видно, что в период от 6 до 24 часов от начала воздействия неполного вакуума у здоровых лиц наблюдается достоверное изменение большинства абсолютных и относительных показателей иммунограмм пузырной жидкости. Состав воспалительной лейкоцитами пузырной жидкости испытывает наибольшие влияния индивидуальных особенностей организма также в этот период наблюдения. В связи с этим достаточно проводить исследования пузырной жидкости в сроки 6 и 24 часа. Кроме того, эти сроки исследования находятся в приемлемом временном диапазоне и с клинко-лабораторной точки зрения оптимальны для процедуры образования кожно-вакуумных пузырей и исследования пузырной жидкости.

Предлагаемый способ малотравматичен, обладает высокой стандартностью в нанесении микротравмы и заборе цитологического материала; не требует значительных усилий для поддержания асептичности (в течение минимум 48 часов пузырная жидкость сохраняет стерильность при сохранении целостности крыш кожно-вакуумных пузырей); характер воспалительной эмиграции в полость кожно-вакуумных пузырей соответствует параметрам асептического воспаления; асептическое воспаление в кожно-вакуумных пузырях протекает в условиях, максимально приближенных к состоянию внутренней среды организма; позволяет в течение суток определить тип системной реакции организма человека на внешнее воздействие и повысить ее диагностическую значимость.

Способ несложен в исполнении, информативен и может быть использован в любом лечебном учреждении.