



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2012132006/15, 25.07.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
25.07.2012

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 25.07.2012

(45) Опубликовано: 10.11.2013 Бюл. № 31

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2292048 C2, 20.01.2007. SU 1734024 A1, 15.05.1992. RU 2236678 C2, 20.09.2004. RU 2251700 C2, 10.05.2005. RU 2315305 C2, 20.01.2008. ПУШКАРЕВ Б.Г. и др. Раннее прогнозирование исхода распространенного гнойного перитонита // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН, 2005, №3 (41).

Адрес для переписки:

660022, г.Красноярск, ул. Партизана
Железняка, 1, КрасГМУ, патентный отдел

(72) Автор(ы):

Савченко Андрей Анатольевич (RU),
Здзитовецкий Дмитрий Эдуардович (RU),
Винник Юрий Семёнович (RU),
Борисов Александр Геннадьевич (RU),
Лузан Наталья Анатольевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
профессионального образования
"Красноярский государственный
медицинский университет имени профессора
В.Ф. Войно-Ясенецкого" Министерства
здравоохранения и социального развития
Российской Федерации (RU)**(54) СПОСОБ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ИСХОДА РАСПРОСТРАНЕННОГО ГНОЙНОГО ПЕРИТОНИТА**

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к способу прогнозирования распространенного гнойного перитонита (РГП). Сущность способа состоит в том, что с помощью билюминесцентного метода определяют активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ), малатдегидрогеназы (МДГ), НАДФ-зависимой глутаматдегидрогеназы (НАДФГДГ) и глутатионредуктазы (ГР) в лимфоцитах периферической крови больных РГП. Затем рассчитывают метаболический коэффициент (МК), представляющий собой

соотношение произведений активности ГР и НАДФГДГ к произведению активностей ЛДГ и МДГ, то есть $МК = (ГР \times НАДФГДГ) / (ЛДГ \times МДГ)$. При значении МК ниже 0,005 прогнозируют неблагоприятный исход заболевания, при МК равном или выше 0,005 прогнозируют благоприятный исход РГП. Использование заявленного способа позволяет осуществить ранний прогноз исхода РГП после постановки диагноза и обеспечить высокий уровень достоверности прогноза. 4 пр., 2 табл.

RU 2 4 9 8 3 0 0 C 1

RU 2 4 9 8 3 0 0 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
G01N 33/48 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2012132006/15, 25.07.2012

(24) Effective date for property rights:
25.07.2012

Priority:

(22) Date of filing: 25.07.2012

(45) Date of publication: 10.11.2013 Bull. 31

Mail address:

660022, g.Krasnojarsk, ul. Partizana Zheleznjaka,
1, KrasGMU, patentnyj otdel

(72) Inventor(s):

Savchenko Andrej Anatol'evich (RU),
Zdzitovetskij Dmitrij Ehdvardovich (RU),
Vinnik Jurij Semenovich (RU),
Borisov Aleksandr Gennad'evich (RU),
Luzan Natal'ja Anatol'evna (RU)

(73) Proprietor(s):

Gosudarstvennoe bjudzhetnoe obrazovatel'noe
uchrezhdenie vysshego professional'nogo
obrazovanija "Krasnojarskij gosudarstvennyj
meditsinskij universitet imeni professora V.F.
Vojno-Jasenetskogo Ministerstva
zdravookhraneniya i sotsial'nogo razvitija
Rossijskoj Federatsii" (RU)

(54) METHOD FOR PREDICTION OF OUTCOME OF WIDESPREAD PURULENT PERITONITIS

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: bioluminescent method is used to determine lactate dehydrogenase (LDG), malate dehydrogenase (MDG), NADP-dependent glutamate dehydrogenase (NADPGDG) and glutathione reductase (GR) activities in peripheral blood lymphocytes in patients with widespread purulent peritonitis. That is followed by calculating a metabolic coefficient (MC) representing the relation of a production of GR and NADPGDG activities to a

production of LDG and MDG activities, i.e. $MC = \frac{GR \times NADPGDG}{LDG \times MDG}$. If the MC is below 0.005, an unfavourable outcome of the disease is predicted, while the MC being 0.005 or higher, a favourable outcome of widespread purulent peritonitis is predicted.

EFFECT: using the declared method enables the higher early post-diagnosing prediction of the outcome of widespread purulent peritonitis and the higher level of prediction reliability.

4 ex, 2 tbl

Изобретение относится к медицине, а именно к анестезиологии и реаниматологии и может быть использовано для определения исхода распространенного гнойного перитонита (РГП).

Известен способ прогнозирования неблагоприятного исхода распространенного перитонита, заключающийся в исследовании у больных содержания лактоферрина в перитонеальном экссудате в первые сутки послеоперационного периода и при значении показателя менее 2500 нг/мл прогнозируют неблагоприятный исход [2]. Недостатком способа является необходимость исследования перитонеального экссудата в первые сутки после операции, что задерживает начало мероприятий, направленных на обеспечение благоприятного исхода заболевания.

Известен способ прогнозирования исхода комплексного лечения больных РГП при абдоминальном введении имозимазы с определением показателей уровня плазминогена, продуктов деградации фибриногена и фибрина, а также показателей агрегации и дезагрегации тромбоцитов при поступлении и в процессе лечения больного [3]. Недостатком способа является длительность проведения исследований для формирования прогноза исхода заболевания.

Наиболее близким к предлагаемому является способ прогнозирования исхода заболевания больных РГП с определением на 2 сутки заболевания концентрации общего холестерина (ОХс), холестерина липопротеидов высокой плотности (Хс-ЛПВП), величины лейкоинтоксикационного индекса (ЛИИ), индекса сдвига лейкоцитов (ИСЛ) и при концентрации ОХс ниже 2,5 ммоль/л, Хс-ЛПВП ниже 0,9, значении ЛИИ выше 4,0 и ИСЛ выше 6,0 прогнозируют неблагоприятный исход лечения [4]. Недостатком способа является необходимость определения заявляемых показателей только на 2 сутки заболевания, что задерживает начало мероприятий, направленных на обеспечение благоприятного исхода РГП.

Задачей предлагаемого способа является раннее прогнозирование (в 1 сутки после установки диагноза) исхода РГП.

Поставленную задачу осуществляют за счет того, что с помощью биoluminesцентного метода определяют активности ЛДГ, МДГ, НАДФГДГ и ГР в лимфоцитах периферической крови больных РГП в 1 сутки после постановки диагноза. Затем рассчитывают метаболический коэффициент (МК), представляющий собой соотношение произведений активности ГР и НАДФГДГ к произведению активностей ЛДГ и МДГ, то есть

$$\text{МК} = (\text{ГР} \times \text{НАДФГДГ}) / (\text{ЛДГ} \times \text{МДГ}).$$

При значении МК ниже 0,005 прогнозируют неблагоприятный исход заболевания, при МК равном или выше 0,005 прогнозируют благоприятный исход РГП.

Значение 0,005 получено опытным путем на основании сопоставления значений рассчитываемого МК и данных последующего наблюдения за клиническим состоянием больных РГП. Значение МК ниже 0,005 свидетельствует о снижении активности ферментативных реакций, окисляющих НАДФН, которые реализуют антиоксидантные функции и осуществляют перенос интермедиатов с энергетических процессов на реакции аминокислотного обмена.

Способ осуществляют следующим образом. У больных в первые сутки после постановки диагноза РГП забирают венозную кровь из локтевой вены свободным током в пробирки с гепарином. Выделяют лимфоциты. Центрифугируют в градиенте плотности фиколл-верографина по стандартной методике А. Vouum (1968) [7]. Подсчитывают количество лимфоцитов, например, в камере Горяева. При контроле морфологического состава лейкоцитарных взвесей определяют чистоту выхода

лимфоцитов, которая составляет не менее 97%. 1 млн. выделенных клеток используют для определения активности ЛДГ, МДГ, НАДФГДГ и ГР лимфоцитов одним из известных способов, например, билюминесцентным [5, 6]. Для этого суспензию выделенных лимфоцитов, содержащую клетки в концентрации 1,0 млн/мл, разрушают путем осмотического лизиса с добавлением дистиллированной воды (1:5 по объему) и 1,0-2,0 мМ дитиотреитола. Затем непосредственно определяют активность ЛДГ, МДГ, НАДФГДГ и ГР. Для этого в 150 мкл инкубационной смеси, содержащей соответствующий субстрат и кофактор, вносят 50 мкл суспензии разрушенных лимфоцитов. Конкретные значения концентраций субстратов и коферментов, а также рН среды для определяемых ферментов представлены в таблице 1.

Таблица 1			
Концентрация субстратов и коферментов и рН буфера для определяемых ферментов			
Фермент	Субстрат, мМ	Кофактор, мМ	рН буфера
ЛДГ	Лактат - 2,0	НАД - 0,50	9,0
МДГ	Малат - 2,0	НАД - 2,50	9,8
НАДФГДГ	Оксоглутарат - 100	НАДФН - 0,0025	7,4
ГР	GSH - 0,5	НАДФН - 0,0025	7,4
Примечание: среду с рН 9,0 и 9,8 готовят на Трис-НСI буфере (ICN Biomedicals Inc., США); с рН 7,4 - на K ⁺ , Na ⁺ -фосфатном буфере (буфер готовят из K ₂ HPO ₄ и NaH ₂ PO ₄ (Реахим, Россия)).			

Необходимо отметить, что в инкубационную смесь для определения активности НАДФГДГ дополнительно вносят NH₄Cl в концентрации 5,0 мМ.

После инкубации исследуемых проб при 37°C в течение 30 минут для ЛДГ и МДГ и 5 минут для НАДФГДГ и ГР к 200 мкл инкубационной смеси добавляют 50 мкл флавиномононуклеотида (ФМН) в концентрации $1,5 \times 10^{-5}$ М, 50 мкл 0,0005% миристинового альдегида и 10 мкл ферментативной системы НАДН : ФМНОксидоредуктаза-люцифераза (все реактивы билюминесцентной системы разводят в 0,1 М K⁺, Na⁺-фосфатном буфере с рН 7,0). После смешивания билюминесцентных реактивов и инкубационной пробы с помощью биохемилюминометра, например марки "БЛМ-8803" измеряют свечение. Учитывая, что в клетках имеется определенное количество субстратов для течения различных метаболических реакций, в том числе и катализируемых исследуемыми ферментами, определяют показатели, условно названные - субстратный фон ферментов. Определяют в тех же условиях, что и для вышеперечисленных дегидрогеназ, но в инкубационную смесь вместо соответствующего субстрата вносят буфер. В результате измерения свечения на билюминометре получают относительные значения активности исследуемых ферментов. Чтобы получить абсолютные значения активности строят графики зависимости интенсивности билюминесценции от концентрации НАДН и НАДФН (калибровочный график). Для этого 200 мкл стандартного раствора НАДИ или НАДФН в диапазоне 10^{-9} - 10^{-4} М вносят в кюветы билюминометра, содержащие ФМН, миристиновый альдегид и НАД(Ф)Н : ФМНОксидоредуктазу-люциферазу в концентрациях указанных выше, после чего производят измерение интенсивности билюминесценции. В связи с широким диапазоном рН буферов, используемых для определения дегидрогеназной активности, а также рН-зависимостью билюминесценции ферментативной системы из светящихся бактерий, калибровочные графики строят для каждого рН буфера. Активность ферментов рассчитывают по формуле:

$$A = \Delta[C] \times V / T$$

где:

A - активность фермента, E на 1×10^4 лимфоцитов ($1E=1$ мкмоль/мин [1]);
 $\Delta[C]$ - разница концентраций НАДН или НАДФН в пробах "фермент" и "фон фермента", мкмоль;

V - объем пробы, мл;

T - время инкубации, мин.

Затем по активности ЛДГ, МДГ, НАДФГДГ и ГР рассчитывают величину МК как соотношение произведений активности ГР и НАДФГДГ к произведению активностей ЛДГ и МД. При значении МК ниже 0,005 прогнозируют неблагоприятный исход заболевания, при МК равном или выше 0,005 прогнозируют благоприятный исход РГП.

Данный способ апробирован на 31 больном РГП.

Прогноз исхода РГП по значению МК			Таблица 2
№	Прогноз исхода РГП	МК	
1	Благоприятный исход	0,179	
2	Неблагоприятный исход	0,002	
3	Благоприятный исход	0,006	
4	Благоприятный исход	0,327	
5	Неблагоприятный исход	0,00003	
6	Благоприятный исход	0,183	
7	Благоприятный исход	0,394	
8	Благоприятный исход	7,589	
9	Неблагоприятный исход	0,001	
10	Благоприятный исход	0,212	
11	Благоприятный исход	0,039	
12	Неблагоприятный исход	0,004	
13	Благоприятный исход	1,001	
14	Неблагоприятный исход	0,0008	
15	Благоприятный исход	0,324	
16	Благоприятный исход	0,008	
17	Неблагоприятный исход	0,0004	
18	Благоприятный исход	1,230	
19	Неблагоприятный исход	0,004	
20	Благоприятный исход	0,056	
21	Неблагоприятный исход	0,001	
22	Благоприятный исход	0,532	
23	Благоприятный исход	0,946	
24	Неблагоприятный исход	0,003	
25	Благоприятный исход	0,290	
26	Неблагоприятный исход	0,002	
27	Благоприятный исход	0,0048	
28	Благоприятный исход	0,612	
29	Благоприятный исход	0,101	
30	Неблагоприятный исход	0,001	
31	Благоприятный исход	0,273	

По результатам проведенного определения МК и последующему анализу исхода заболевания установлено, что у 30 больных наблюдалось совпадение прогноза (96,8% совпадений). У одного больного с благоприятным исходом заболевания МК составил 0,0048. Следовательно, чувствительность метода составила 96,8%, специфичность равна 100%.

Клинический пример 1.

Больной В., 33 года (история болезни №26230) доставлен скорой помощью в МБУЗ

ГКБСМП им. Н.С. Карповича г.Красноярска с клиникой перитонита. Сопутствующий диагноз: хронический панкреатит. Из анамнеза известно, что болеет в течении 2-х суток.

5 При исследовании лимфоцитов периферической крови биоломинесцентным методом с определением активности ЛДГ, МДГ, НАДФГДГ и ГР обнаружено, что величина МК составила 0,212 (прогнозируется благоприятный исход РПГ).

10 Больной оперирован в экстренном порядке. На операции выявлена перфоративная язва желудка, распространенный гнойный перитонит. Произведено ушивание перфоративной язвы, санация, дренирование брюшной полости. Через 48 часов произведена программированная санация брюшной полости.

15 В послеоперационном периоде в течении 7 дней в условиях ОРИТ проводилась инфузионная, антибактериальная, симптоматическая терапия, перевязки. Затем, по стабилизации состояния, переведен в хирургическое отделение, где консервативная терапия продолжена.

Послеоперационный период без осложнений. Больной выписан на 21-е сутки в удовлетворительном состоянии на амбулаторное лечение у хирурга по месту жительства.

20 Клинический пример 2.

Больной Г., 44 года (история болезни №16323) доставлен скорой помощью в МБУЗ ГКБСМП им. Н.С. Карповича г.Красноярска с клиникой перитонита. Из анамнеза известно, что болеет в течении 2-х суток, а сутки назад боли в животе приняли разлитой характер.

25 При исследовании лимфоцитов периферической крови биоломинесцентным методом с определением активности ЛДГ, МДГ, НАДФГДГ и ГР обнаружено, что величина МК составила 1,001 (прогнозируется благоприятный исход РПГ).

30 Больной оперирован в экстренном порядке. На операции выявлен гангренозно-перфоративный аппендицит, распространенный гнойный перитонит. Произведена аппендэктомия, санация, дренирование брюшной полости. На 2-е и 4-е сутки после первичной операции произведены программированные санации брюшной полости.

35 В послеоперационном периоде в течении 5 дней в условиях ОРИТ проводилась инфузионная, антибактериальная, симптоматическая терапия, перевязки. Затем консервативная терапия продолжена в хирургическом отделении.

Послеоперационный период без осложнений. Больной выписан на 21-е сутки в удовлетворительном состоянии на амбулаторное лечение у хирурга по месту жительства.

40 Клинический пример 3.

Больная Г., 73 года (история болезни №11541) доставлена скорой помощью в МБУЗ ГКБСМП им. Н.С. Карповича г.Красноярска с клиникой ущемленной вентральной грыжи, перитонита. Сопутствующий диагноз: ИБС, гипертоническая болезнь. Из анамнеза известно, что болеет в течении 40 часов.

45 При исследовании лимфоцитов периферической крови биоломинесцентным методом с определением активности ЛДГ, МДГ, НАДФГДГ и ГР обнаружено, что величина МК составила 0,004 (прогнозируется неблагоприятный исход РПГ).

50 Больной в экстренном порядке произведена герниолапаротомия. На операции выявлен некроз участка тонкой кишки с перфорацией, распространенный гнойный перитонит. Произведена резекция тонкой кишки с наложением анастомоза, санация, дренирование брюшной полости. На 2-е и 4-е сутки после первичной операции произведены программированные санации брюшной полости.

В послеоперационном периоде в условиях ОРИТ проводилась инфузионная, антибактериальная, симптоматическая терапия, перевязки. Послеоперационный период на 13-е сутки после последней программной санации осложнился эвентрацией. Произведено ушивание эвентрации. Несмотря на проводимую терапию состояние больной ухудшалось, нарастала полиорганная недостаточность. На 34-е сутки госпитализации констатирована смерть.

Клинический пример 4.

Больной С., 53 года (история болезни №14710) доставлен скорой помощью в МБУЗ ГКБСМП им. Н.С. Карповича г.Красноярска с клиникой перфорации полого органа, перитонита. Из анамнеза известно, что болеет в течении 8 дней.

При исследовании лимфоцитов периферической крови билюминесцентным методом с определением активности ЛДГ, МДГ, НАДФГДГ и ГР обнаружено, что величина МК составила 0,001 (прогнозируется неблагоприятный исход РПП).

Больной в экстренном порядке оперирован. На операции выявлена перфорация ободочной кишки, распространенный гнойный перитонит. Произведена колостомия, санация, дренирование брюшной полости. Через 48 часов произведена программированная санация брюшной полости.

В послеоперационном периоде в условиях ОРИТ проводилась инфузионная, антибактериальная, симптоматическая терапия, перевязки. Несмотря на проводимую терапию состояние больного ухудшалось, нарастала полиорганная недостаточность с развитием септического шока. На 3-й сутки госпитализации констатирована смерть.

Преимуществами предлагаемого способа являются:

1) возможность раннего прогноза исхода РПП - в течение 1 суток после постановки диагноза;

2) высокий уровень достоверности прогноза - 96,8%. Предложенный способ может быть рекомендован для применения в клинической практике.

Используемые источники

1. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия. - М.: Медицина, 1998. - 704 с.

2. Патент РФ №2251700 С2, G01N 33/68, G01N 33/48, G01N 33/53, БИПМ №13, 10.05.2005.

3. Патент РФ №2275632 С2, G01N 33/48, G01N 33/49, G01N 33/50, БИПМ №12, 27.04.2006.

4. Патент РФ №2292048 С2, G01N 33/92, БИПМ №2, 20.01.2007.

5. Савченко А.А., Сунцова Л.Н. Высококчувствительное определение активности дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови человека билюминесцентным методом // Лабораторное дело. - 1989. - №11. - С.23-25.

6. Савченко А.А. Билюминесцентное определение активности НАД- и НАДФ-зависимых глутаматдегидрогеназ лимфоцитов // Лаб. дело. - 1991. - №11. - С.22-25.

7. Boyum A. Isolation of lymphocytes from blood and bone marrow // Scand. J. Clin. Lab. Invest. - 1968. - Vol.21 (Suppl.97). - P.77-80.

Формула изобретения

Способ прогнозирования исхода распространенного гнойного перитонита (РПП), включающий забор и исследование крови, отличающийся тем, что с помощью билюминесцентного метода в лимфоцитах периферической крови определяют активность глутатионредуктазы - ГР, НАДФ-зависимой глутаматдегидрогеназы - НАДФГДГ, лактатдегидрогеназы - ЛДГ и малатдегидрогеназы - МДГ, после чего рассчитывают метаболический коэффициент - МК, представляющий собой

соотношение произведений активности ГР и НАДФГДГ к произведению активностей ЛДГ и МДГ, и при значении МК ниже 0,005 прогнозируют неблагоприятный исход заболевания, при МК равном или выше 0,005 прогнозируют благоприятный исход РГП.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50