



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **76953** (13) **U**  
(51) МПК (2013.01)  
**A61B 17/00**  
**G01N 33/48** (2006.01)  
**G01N 21/64** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

<p>(21) Номер заявки: <b>u 2012 07441</b></p> <p>(22) Дата подання заявки: <b>19.06.2012</b></p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>25.01.2013</b></p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>25.01.2013, Бюл.№ 2</b></p>	<p>(72) Винахідник(и): <b>Герич Ігор Дионісійович (UA), Булавенко Ольга Василівна (UA), Остап'юк Леся Романівна (UA), Волошиновський Анатолій Степанович (UA), Мягкота Степан Васильович (UA)</b></p> <p>(73) Власник(и): <b>ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. М.І. ПИРОГОВА, вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, 21018 (UA)</b></p>
---	--

**(54) СПОСІБ РАННЬОЇ ДІАГНОСТИКИ ГНІЙНО-СЕПТИЧНИХ УСКЛАДНЕНЬ ЗА ДОПОМОГОЮ МЕТОДУ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЇ СПЕКТРОСКОПІЇ**

**(57) Реферат:**

Спосіб ранньої діагностики гнійно-септичних ускладнень за допомогою методу флуоресцентної спектроскопії включає дослідження сироватки крові при госпіталізації хворих у стаціонар та в процесі лікування за допомогою спектрально-флуоресцентного комплексу, шляхом збудження сироватки крові світлом.

UA 76953 U



Корисна модель належить до медицини, зокрема хірургії, акушерства та гінекології і може бути використана для вибору способу діагностики гнійно-септичних ускладнень.

Відомий спосіб діагностики сепсису на основі критеріїв синдрому системної запальної відповіді та результатів проведення посіву крові на стерильність [1], що потребує достатньо тривалого періоду очікування (2-7 днів) клінічно-лабораторної симптоматики і результатів бактеріологічних досліджень.

Відомий також спосіб, що є найближчим аналогом, з використанням методу флуоресцентних зондів при важкій ендогенній інтоксикації у пацієнтів з гнійно-септичними ускладненнями, за допомогою якого проводять оцінку ефективної та загальної концентрації альбуміну (ЕКА та ЗКА) при поступленні хворих у стаціонар та в процесі лікування [2]. ЕКА дає інформацію про кількість повноцінного альбуміну в сироватці крові (СК), що має нормальну зв'язуючу здатність (в нормі ЕКА співпадає із ЗКА). У пацієнтів з гнійно-септичними ускладненнями зв'язуюча здатність альбуміну знижена, що обмежує надходження токсичних продуктів до органів детоксикації і поглиблює ендогенну інтоксикацію. Різке зниження показників ЕКА, співвідношення ЕКА/ЗКА є прогностично несприятливими ознаками. Однак цей спосіб є трудомістким, вимагає використання специфічних флуоресцентних зондів, відповідного обладнання та спеціально навченого персоналу, що обмежує його широке застосування в закладах охорони здоров'я.

В основу корисної моделі поставлено задачу - створити спосіб діагностики гнійно-септичних станів, що дозволить проводити ранню діагностику сепсису без використання флуоресцентних зондів.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі діагностики гнійно-септичних ускладнень методом флуоресцентної спектроскопії, що включає дослідження сироватки крові при госпіталізації хворих у стаціонар та в процесі лікування, згідно з корисною моделлю, дослідження сироватки крові проводять за допомогою спектрально-флуоресцентного комплексу, змонтованого на базі монохроматора МДР-2, шляхом збудження сироватки крові світлом з довжиною хвилі 280 нм і при реєстрації додаткового піку в області 380 нм діагностують у хворих гнійно-септичні ускладнення.

Дослідження сироватки крові проводять методом флуоресцентної спектроскопії шляхом збудження сироватки крові світлом з довжиною хвилі 280 нм, що відповідає області свічення триптофанового амінокислотного залишку сироваткового альбуміну людини з реєстрацією спектрів флуоресценції та спектрів збудження флуоресценції сироватки крові, які суттєво відрізняються від відповідних величин у здорових людей внаслідок утворення у хворих з ендогенною інтоксикацією, властивою гнійно-септичним станам, продуктів взаємодії сироваткового альбуміну людини з продуктами метаболізму бактерій, що призводить до зміни спектрально-флуоресцентних характеристик сироватки крові [2]. Флуоресцентний комплекс, змонтований на базі монохроматора МДР-2, забезпечує надійне вимірювання флуоресцентних параметрів досліджуваних об'єктів. Зокрема, за його допомогою виявляють нові особливості власної флуоресценції широкозонних кристалів, квантово-розмірні ефекти в флуоресценції напівпровідникових нанокристалів, досліджують перенесення енергії в лампових люмінофорах.

Ранню діагностику гнійно-септичних ускладнень проводять за допомогою спектрально-флуоресцентного комплексу, змонтованого на базі монохроматора МДР-2 (ЛОМО, Санкт-Петербург, Росія). Як джерело збуджуючого світла використовують дейтерієву лампу ДДС-400 (ЛОМО, Санкт-Петербург, Росія) з неперервним спектром випромінювання в області  $\lambda=200-420$  нм. Необхідна ділянка збуджуючого світла виділяється за допомогою монохроматора МДР-12 (ЛОМО, Санкт-Петербург, Росія). Збудження сироватки крові для вимірювання спектру флуоресценції проводиться світлом з довжиною хвилі 280 нм, що відповідає області свічення триптофанового амінокислотного залишку. При цьому спектри флуоресценції реєструються в діапазоні  $300 \text{ нм} < \lambda < 450 \text{ нм}$ . Спектри флуоресценції сироватки крові реєструють фотоелектронним помножувачем ФЕУ-100 (МЭЛЗ, Москва, Росія). Сигнал з фотоелектронного помножувача ФЕУ-100 в режимі відліку одиночних фотонів перетворюється в цифровий код за допомогою аналогового цифрового перетворювача і обробляється персональним комп'ютером типу IBM. Результати досліджень виводяться в графічній та цифровій формі.

Зміни, які реєструють у хворих за допомогою методу флуоресцентної спектроскопії, на 24-48 годин випереджають клінічно-лабораторні симптоми. Після ранньої діагностики сепсису і призначення відповідного лікування проводять дослідження сироватки крові методом флуоресцентної спектроскопії в динаміці. Реєстрація зменшення амплітуди піку в області 380 нм або його повного зникнення корелює з клінічно-лабораторними показниками хворих. Таким чином, за допомогою цього способу можна проводити ранню діагностику септичного процесу і моніторинг стану хворих в процесі лікування аж до одужання.

Експериментальні дослідження ілюструють графічні зображення, де  $I_{\phi}$  - інтенсивність флуоресценції,  $\lambda$  - довжина хвилі. На Фіг. 1 показано графік, що відображає вплив розведення центрифугованими посівами *St. aureus* (ЦП) на спектри флуоресценції (СФ) сироватки крові здорових осіб. На Фіг. 2 представлено зміни спектрів флуоресценції сироватки крові у хворі на сепсис в динаміці під час лікування. На Фіг. 3 зображено вплив розведення дистильованою водою на спектри флуоресценції сироватки крові здорових осіб.

Спосіб ранньої діагностики гнійно-септичних ускладнень здійснюють таким чином.

При госпіталізації хворих у стаціонар і в динаміці у процесі лікування проводять дослідження їх сироватки крові методом флуоресцентної спектроскопії за допомогою спектрально-флуоресцентного комплексу, змонтованого на базі монохроматора МДР-2. При цьому, коли поряд з піком в області 340 нм реєструється наявність додаткового піку в області 380 нм, діагностують гнійно-септичні ускладнення у хворих.

У хворих з гнійно-септичними ускладненнями у спектрах флуоресценції поряд з піком в області 337 нм, що відповідає спектру свічення сироваткового альбуміну людини в нормі, реєструється наявність додаткового піку в області 380 нм, що відображає флуоресценцію сполук альбуміну з продуктами метаболізму бактерій і є аналогом флуоресценції штучно створеної нами "спектрально-флуоресцентної моделі сепсису *in vitro*" (сироватка крові та 10 % бактерій).

Для того, щоб переконатися у правильності наших тверджень, створено флуоресцентно-спектральну модель сепсису *in vitro* шляхом розведення СК ЦП бактерій. Було виготовлено 11 стандартних розчинів СК ЦП бактерій: 1 - СК, 2-90 % СК, 3-80 % СК, 4-70 % СК, 5-60 % СК, 6-50 % СК, 7-40 % СК, 8-30 % СК, 9-20 % СК, 10-10 % СК, 11 - ЦП. Збудження цих розчинів проводили світлом з довжиною хвилі 280 нм. Результати дослідження СФ розведень СК ЦП бактерій наведені на Фіг. 1. При розведенні СК ЦП бактерій  $I_{\phi}$  поступово зменшується зі збільшенням вмісту бактерійної культури в розчині. При цьому також відзначається довгохвильовий зсув смуг флуоресценції ( $\lambda_{\max}$ ) розведень. Слід відзначити, що виявлений ефект зміни спектрально-флуоресцентних характеристик розведень СК ЦП бактерій зумовлений впливом бактерій та продуктів їх метаболізму на флуоресцентні характеристики СК.

Зміни СФ СК при розведенні СК ЦП бактерій мали специфічний характер і сформували підґрунтя для напрацювання флуоресцентного методу для ранньої діагностики сепсису шляхом вивчення спектрально-флуоресцентної моделі сепсису *in vivo*.

Спектри флуоресценції сироватки крові аналізували монохроматором МДР-2, змінюючи кут повороту дифракційної ґратки за допомогою крокового двигуна, та реєстрували фотоелектронним помножувачем ФЕУ-100, на який подавалася напруга живлення з високовольтного стабілізованого джерела БЛ БНВ 3-09 (Київ, Україна).

Спектр збудження флуоресценції сироватки крові вимірювався також з використанням спектрально-флуоресцентного комплексу, змонтованого на базі монохроматора МДР-2. Необхідна ділянка спектру збудження флуоресценції сироватки крові виділялася за допомогою монохроматора МДР-12. Дискретна зміна довжини хвилі збуджувачого світла лампи ДДС-400 здійснювалась поворотом дифракційної ґратки монохроматора МДР-12. Збудження сироватки крові для вимірювання спектру флуоресценції проводили світлом з довжиною хвилі 280 нм, що відповідає області свічення триптофанового амінокислотного залишку. При цьому спектри флуоресценції реєструвалися в діапазоні 300-450 нм.

Сигнал з фотоелектронного помножувача ФЕУ-100 в режимі відліку одиночних фотонів перетворювався в цифровий код за допомогою аналогового цифрового перетворювача і оброблявся персональним комп'ютером типу IBM. Результати виводилися в графічній та цифровій формі.

Спосіб флуоресцентної спектроскопії для ранньої діагностики сепсису використовувався для хворих, які перебували на стаціонарному лікуванні в гнійно-септикологічному центрі Комунальної міської клінічної лікарні швидкої медичної допомоги м. Львова. Запропонований спосіб дав змогу за допомогою дослідження сироватки крові методом флуоресцентної спектроскопії проводити ранню діагностику септичних процесів, що дозволило вчасно призначити ефективне лікування, забезпечити виживання і видужування хворих та зменшити тривалість їх перебування в стаціонарі.

Клінічний приклад.

Хвора Б., 33 р., поступила в гнійно-септикологічний центр Комунальної міської клінічної лікарні швидкої медичної допомоги м. Львова з масивною заочеревинною внутрішньотазовою флегмоною та тяжким сепсисом. На час госпіталізації - критично тяжкий стан хворої та верифікована бактеріємія (посів крові - *St. aureus*). При обстеженні хворої методом флуоресцентної спектроскопії зафіксовано, що максимум смуги флуоресценції СК хворої

зміщений у довгохвильову область на  $\Delta\lambda=40$  нм і зареєстровано новий пік в області 380 нм, замість піку флуоресценції здорових осіб (з максимумом в області 337 нм), а інтенсивність флуоресценції становила 0,3 від  $I_{\phi}$  здорових осіб (Фіг. 2, крива 1). Після оперативного втручання і інтенсивної протисептичної терапії та триваючої бактеріємії (посів крові - *St. aureus*) констатовано суттєве покращення та стабілізацію стану хворої: аналіз СФ СК хворої на сьому післяопераційну добу виявив, що зсув її смуги флуоресценції значно зменшився і становив  $\Delta\lambda=7$  нм. Водночас, значно зросла інтенсивність цієї смуги, яка становила 1,07  $I_{\phi}$  (Фіг. 2, крива 2). Зважаючи на субкомпенсовані зміни абсолютного кількісного та якісного вмісту білків СК на час обстеження (біохімічні дослідження - загальний білок і білкові фракції на нижній межі норми), стрімке зростання інтенсивності смуги флуоресценції СК пацієнтки не можна було трактувати абсолютною гіпопротеїнемією, яка типово спричиняє послаблення концентраційного гасіння флуоресценції, властиве для флуоресценції білків. Єдиним можливим поясненням зареєстрованого нами вище феномену зростання інтенсивності смуги флуоресценції СК цієї пацієнтки могла бути наявність у цей період лікування транзиторної гіперволемії: об'єм щоденних довенних інфузій впродовж цього періоду лікування становив 8-10 л. За таких обставин закономірне збільшення рідинної компоненти СК призводить до псевдогіпопротеїнемії. На нашу думку, вимушене надмірне терапевтичне розрідження крові в цей період стало причиною послаблення концентраційного гасіння флуоресценції СК пацієнтки і зумовило зростання інтенсивності смуг флуоресценції її СК. Без сумніву, на згаданий вище значний ріст інтенсивності смуги флуоресценції її СК вплинуло зменшення септичної симптоматики. Проведені нами *in vitro* дослідження спектрально-флуоресцентних характеристик стандартних розведень СК здорової особи дистильованою водою (Фіг. 3) підтвердили правильність запропонованого нами пояснення зареєстрованого феномену зростання інтенсивності смуги флуоресценції СК цієї хворої: адже зменшення вмісту СК в пробах після додавання дистильованої води також призводить до значного зростання інтенсивності смуг флуоресценції. На згаданий вище значний ріст інтенсивності смуги флуоресценції її СК вплинуло також зменшення септичної симптоматики. Додатковим підтвердженням цього припущення був факт, що після зміни режиму інфузійної терапії, пов'язаного зі зменшенням септичної симптоматики і домінуванням закономірних для цього етапу сепсису серцево-судинних розладів, за відсутності суттєвих змін лабораторно-біохімічних параметрів, було констатовано зникнення піку в області 380 нм та зменшення інтенсивності смуг флуоресценції СК цієї пацієнтки в області 337 нм в наступних заборах крові до 0,39  $I_{\phi}$ , яке, однак, перевищувало вихідний рівень (Фіг. 2, криві 3, 4, 5) відносно кривої 1.

Суттєве наближення параметрів флуоресценції СК хворої до відповідних показників СК здорової особи констатували через 2,5 місяця після виписки зі стаціонару.

Таким чином, згідно з проведеними дослідженнями СФ СК хворої слід відзначити, що зменшення інтенсивності та зсув смуги флуоресценції зумовлені наявністю заванзованого септичного процесу і корелюють з інтегральними показниками тяжкості клінічного стану та бактеріємією. Динаміка змін спектрально-флуоресцентних характеристик СК згаданої хворої достатньо об'єктивно віддзеркалює перебіг сепсису і корелює з ефективністю лікувальної тактики.

Разом з тим, зміни спектрально-флуоресцентних параметрів СК фіксувалися за 24-48 год. до появи очевидних клініко-лабораторних ознак вогнища інфекції, що дало можливість вчасно вибрати правильну лікувальну тактику, зберегти життя та забезпечити видужання хворої.

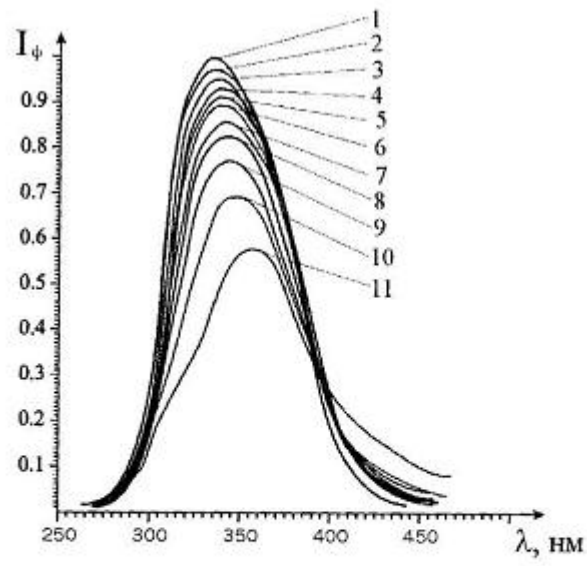
Джерела інформації:

1. Llewelyn M., Cohen J. Diagnosis of infection in sepsis / Intensive Care Med. 2001. Vol. 27. S. 10-32.

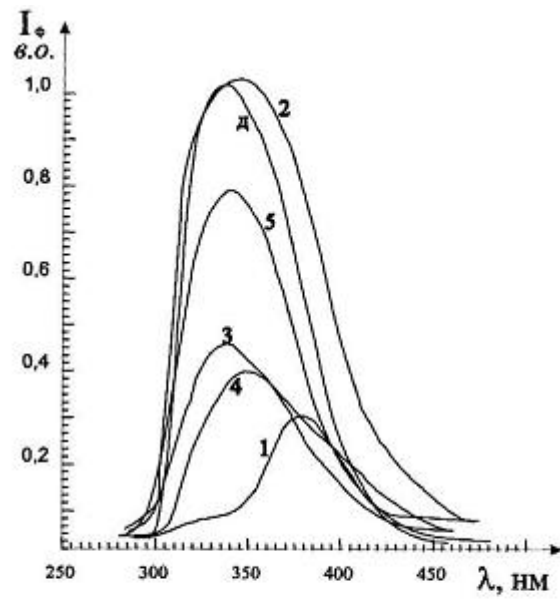
2. Альбумин сыворотки крови в клинической медицине / Под ред. Ю.А. Грызунова и Г.Е. Добрецова. - М.: ГЭОТАР, 1998. - 440 с.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

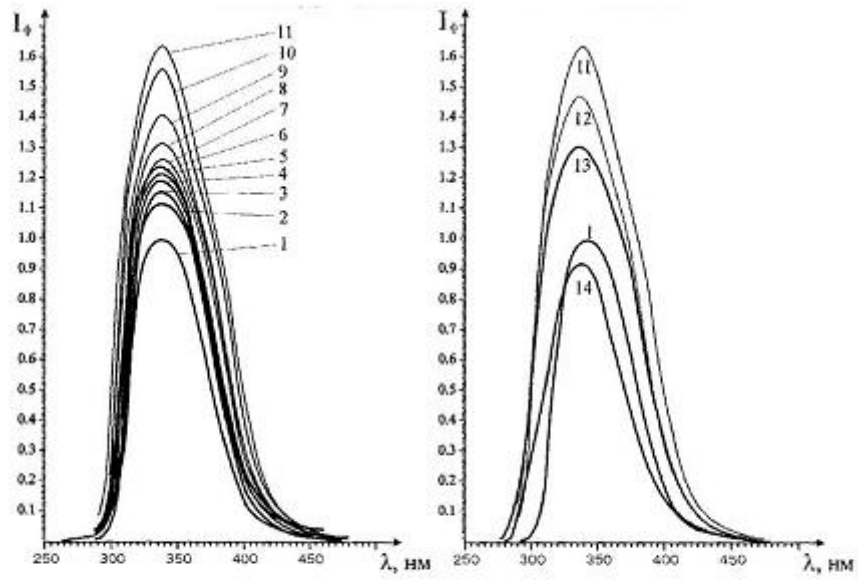
Спосіб ранньої діагностики гнійно-септичних ускладнень за допомогою методу флуоресцентної спектроскопії, що включає дослідження сироватки крові при госпіталізації хворих у стаціонар та в процесі лікування, який **відрізняється** тим, що дослідження сироватки крові проводять за допомогою спектрально-флуоресцентного комплексу, змонтованого на базі монохроматора МДР-2, шляхом збудження сироватки крові світлом з довжиною хвилі 280 нм, і при реєстрації додаткового піку в області 380 нм діагностують у хворих гнійно-септичні ускладнення.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3

---

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

---

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