



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **87971** (13) **U**  
(51) МПК (2014.01)  
**A61B 10/00**  
**G01N 33/487** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: <b>u 2013 11258</b>	(72) Винахідник(и): <b>Остапенко Віра Петрівна (UA), Кайдашев Ігор Петрович (UA), Крючко Тетяна Олександрівна (UA), Кушнерева Тетяна Вікторівна (UA)</b>
(22) Дата подання заявки: <b>23.09.2013</b>	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>25.02.2014</b>	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>25.02.2014, Бюл.№ 4</b>	(73) Власник(и): <b>Остапенко Віра Петрівна, вул. Театральна, 4/6, кв. 7, м. Полтава, 36000 (UA), Кайдашев Ігор Петрович, вул. Леніна, 11/21, кв. 8, м. Полтава, 36026 (UA), Крючко Тетяна Олександрівна, пр. Першотравневий, 13-а, кв. 59, м. Полтава, 36011 (UA), Кушнерева Тетяна Вікторівна, вул. Залізна, 42, кв. 94, м. Полтава, 36021 (UA)</b>

## (54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ РЕЦИДИВУЮЧОГО ПЕРЕБІГУ ХРОНІЧНОГО ПІЄЛОНЕФРИТУ У ДІТЕЙ

### (57) Реферат:

Спосіб прогнозування рецидивуючого перебігу хронічного пієлонефриту у дітей, що включає дослідження крові зі застосування полімеразної ланцюгової реакції, причому розраховують за шкалою критеріїв тяжкості нефрологічної патології ступінь ризику реалізації рецидивуючого перебігу ХП у дітей, шляхом присвоєння кожному критерію оцінки від 0 до 2 балів, внесення показників до розробленої таблиці, обробки і систематизації отриманих результатів, низькому ступеню ризику відповідає оцінка від 0 до 5 балів, середньому ступеню 5-10 балів, високому - більше 10 балів, додатково, дітям із високим ступенем ризику, проводять визначення в крові одиничного нуклеотидного поліморфізму Asp299Gly гена Toll-подібного рецептора 4, виявлення алеля G TLR4 підтверджує та асоціюється з рецидивуючим перебігом хронічного пієлонефриту у дітей зі схильністю до стійкої бактерійурії та підвищеною чутливістю до основних внутрішньоклітинних збудників (*Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma ureolyticum*).

UA 87971 U



Запропонована корисна модель належить до галузі медицини, а саме до медичної генетики та педіатрії, і може бути використана для прогнозування рецидивуючого, хвилеподібного перебігу хронічного пієлонефриту (ХП) в дитячому віці.

Інтерес до вивчення проблеми пієлонефриту (ПН) серед дослідників, що працюють в дитячій нефрології, зберігається протягом багатьох років. Актуальність визначається не тільки високою поширеністю цього захворювання, традиційно становлячи 47-68 % хворих нефрологічного профілю, але й постійним збільшенням кількості дітей з хронічними формами даної патології (Іванов Д.Д. Нефрологія в практиці сімейного лікаря / Д.Д. Іванов, М.О. Корж. - К.: Аврора плюс, 2006. - 272 с.)

Тому пошук інформативних генетичних маркерів, які регулюють ключові ланки патогенезу хронічного запального процесу в нирках, безсумнівно, залишаються одним із пріоритетних завдань сучасної медицини, оскільки рання діагностика генетично обумовленого запального процесу визначає формування груп ризику та ранній початок ефективної первинної профілактики, сприяє зменшенню розповсюдженості тяжких форм захворювання та попередженню інвалідизації дитячого населення.

Відомі способи ранньої діагностики хронічного перебігу пієлонефриту у дітей: Пат. 8616, Україна, МПК А61В 10/00. Спосіб прогнозування розвитку пієлонефриту у дітей/ Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова (UA), Акчурін О.М. (UA). - № u200500416; заявл. 17.01.2005; опубл. 15.08.2005, бюл. № 8; Пат. 27151, Україна, МПК G01N 33/48. Спосіб діагностики ступеня активності пієлонефритичного процесу у дітей/ Інститут нефрології АМН України (UA); Інститут урології АМН України (UA), Мигаль Л.Я., Багдасарова І.В., Дашенко О.О., Король Л.В., Лавренчук О. В., Фоміна С.П. (UA). - № u200703510; заявл. 30.03.2007; опубл. 25.10.2007, бюл. № 17; Пат. 2194281, Российская Федерация, МПК G01N33/52, G01N33/48. Спосіб раннього прогнозування хронічного течення захворювання у дітей, перенесших гострий пієлонефрит /Васильєва Л.І., Набока Ю.Л., Ключка І.В., Васильєв А.Г., Брагіна Л.Е. (RU). - № 2001121445/14; заявл. 30.07.2001; опубл. 10.12.2002.

В останні часи з'явилися роботи, присвячені вивченню генетичних мутацій, зміні імунного статусу, гемостазу у хворих на хронічний пієлонефрит, люпус-нефрит, спадкову нефропатію, нефротичний синдром у дітей (Мазур Л.І. Болезни почек у детей и репродуктивная система / Л.І. Мазур. - Самара: ГОУ ВПО "СамГМУ", 2010. - 254 с.). Найбільш близьким до запропонованого є спосіб прогнозування нефросклерозу, за рахунок визначення мутації G308A гена TNF $\alpha$  (генотип A/A) у дітей з вторинним пієлонефритом та визначення розподілу специфічностей антигенів HLA I та II класів при різних формах і варіантах перебігу ПН у дітей (Сависько А.А. Клинико-иммунологические критерии хронизации пиелонефрита у детей: дисс. ... канд. мед. наук: 14.00.09 / А.А. Сависько. - Ростов-на-Дону, 2009. - 153 с.). Проте, для практичної медицини, та, зокрема, педіатрії, даний спосіб має ряд недоліків, які обумовлені складністю та громіздкістю проведення обстежень, що вимагає значних фінансових затрат, відсутністю чітких критеріїв для призначення подібної методики. Існують дослідження, які свідчать про те, що наявність мутантних алелей генів TLR2 Arg753Gln, TLR4 Asp299Gly підвищують ризик зараження урогенітальними інфекціями, такими як хламідіоз, мікоплазмоз, уреоплазмоз, гарднеліоз, трихомоніаз (Пат. 58647, Україна, МПК G01N 33/50. Спосіб діагностики генетичної схильності до розвитку бактеріальних інфекцій, що передаються статевим шляхом/ Українська медична стоматологічна академія (UA), Ізмайлова І.В., Шликова О.А., Кайдашев І.П. (UA). - № u201008818; заявл. 15.07.2010; опубл. 26.04.2011, бюл. № 8). Однак визначення ролі вищезазначених мутацій генів в перебігу захворювань, викликаних урогенітальними інфекціями, зокрема пієлонефриту у дітей в нашій країні не проводилося.

В основу корисної моделі поставлена задача створити спосіб прогнозування рецидивуючого перебігу хронічного пієлонефриту у дітей, шляхом удосконалення відомого, досягти визначення ризику реалізації гострого пієлонефриту в хронічний з урахуванням шкали тяжкості нефрологічної патології та забезпечити обґрунтованість призначення поглибленого генетичного дослідження поліморфізму гена Toll-подібного рецептора 4 (Asp299Gly), забезпечити раннє виявлення, швидку диференційну діагностику представленої патології.

Поставлену задачу вирішують створенням способу прогнозування хронічного пієлонефриту з рецидивуючим перебігом у дітей, що включає дослідження крові із застосуванням полімеразої ланцюгової реакції, який, згідно з корисною моделлю, відрізняється тим, що розраховують за шкалою критеріїв тяжкості нефрологічної патології ступінь ризику реалізації рецидивуючого перебігу ХП у дітей, шляхом присвоєння кожному критерію оцінки від 0 до 2 балів, внесення показників до розробленої таблиці, обробки і систематизації отриманих результатів. Низькому ступеню ризику відповідає оцінка від 0 до 5 балів, середньому 5-10 балів, високому ступеню - більше 10 балів, додатково, дітям із високим ступенем ризику щодо рецидивуючого

хвилеподібного перебігу ХП, проводять визначення одиничних нуклеотидних поліморфізмів Asp299Gly гена Toll-подібного рецептора 4, шляхом полімеразної ланцюгової реакції. Виявлення алеля G TLR4 підтверджує та асоціюється з рецидивуючим перебігом хронічного пієлонефриту у дітей зі схильністю до стійкої бактерійурії та підвищеною чутливістю до основних внутрішньоклітинних збудників (*Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma ureolyticum*).

Запропонований спосіб здійснюють наступним чином: при клініко-генеалогічному обстеженні хворого із хронічним пієлонефритом визначали ступінь ризику щодо рецидивуючого перебігу, який включав найбільш значимі ознаки доклінічної картини генетично обумовленого формування хронічного запалення в інтерстиції нирок запропонованими критеріями: спадковість, супутня причиннозначима патологія, мікробний пейзаж сечі, лабораторні критерії. Всі отримані дані вносили в розроблену таблицю.

Таблиця

Шкала тяжкості нефрологічної патології

Критерії	Оцінка критерію в балах при його наявності	загальна оцінка (бал)
<b>Спадковість</b>		
- по материнській лінії	2	6,5
- по батьківській лінії	1	
- мати	1	
- батько	1	
- дядько, тітка	0,5	
- брати, сестри	0,5	
- бабуса, дідусь	0,5	
- бактерійурія під час вагітності	1	2,5
- наявність TORCH-інфекції у матері	1	
- патологія вагітності у матері (нефропатія, гестоз, загроза переривання та ін.)	0,5	
<b>Супутня патологія</b>		
- захворювання генітальної системи	1	4,0
- вроджені вади сечовидільної системи	1	
- часті епізоди ГРВІ	2	
<b>Виділення збудника</b>		
- виділення кишкової палички при бакпосіві сечі $\geq 10^5$ КУО/мл	2	5,5
- виділення <i>Ureaplasma ureolyticum</i> методом ПЛР	1	
- виділення <i>Mycoplasma hominis</i> методом ПЛР	1	
- виділення бактерій і молекулів	1,5	
<b>Лабораторні критерії</b>		
Лейкоцитурія понад 25 тис./мл	1	1,5
Лейкоцитоз до $10 \times 10^9$ /л	0,5	

Запропонована шкала критеріїв тяжкості нефрологічної патології дає можливість визначити ступінь ризику реалізації рецидивуючого перебігу хронічного пієлонефриту у дітей: сума балів від 1 до 5 - визначена як низький ризик реалізації хронічної патології, 5-10 - середній ступінь ризику, відповідно, більше 10 балів - високий ризик реалізації ХП з рецидивуючим перебігом.

Запропонована шкала дає можливість сформувати групу дітей із потенційним ризиком реалізації рецидивуючого перебігу ХП, які підлягають поглибленому генетичному дослідженню, а саме, визначенню поліморфізму гена TLR4 Asp299Gly. Матеріал для дослідження - венозна периферична кров. Геномну ДНК виділяли за допомогою набору "ДНК-експрес". Поліморфізм гена TLR4 Asp299Gly визначали, застосовуючи полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) з використанням специфічних олігонуклеотидних праймерів. Для ідентифікації алелей проводили рестрикційний аналіз ампліконів за допомогою ендонуклеази рестрикції Bsp19. Продукт розщеплення поліморфної ділянки гена TLR4 (Asp299Gly) виявляли за допомогою електрофорезу в 3 % агарозному гелі. Гель забарвлювали етидіумом бромідом з подальшою візуалізацією результатів в УФ-світлі. Запропонована методика дає можливість визначити 3

типи генотипу гена Toll-подібного рецептора 4: GG/GG - гомозигота мутантного типу, AA/AG - гетерозигота, AA/AA-"дикий" тип розподілу алелей. Виявлення алеля G TLR4 за результатами проведених полімеразних ланцюгових реакцій засвідчує та асоціюється з рецидивуючим перебігом хронічного пієлонефриту у дітей зі схильністю до стійкої бактерійурії та підвищеною чутливістю до основних внутрішньоклітинних збудників (*Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma ureolyticum*).

Приклад конкретного виконання

Хвора Єлизавета Т., мешкає у Полтавській області, Кременчуцькому районі, м. Комсомольськ. Вік 10 років. Знаходилася на стаціонарному обстеженні та лікуванні в педіатричному відділенні № 2 (нефрологічні ліжка) Полтавської обласної дитячої клінічної лікарні з 14.05.12 по 24.05.12 р. з діагнозом: "Хронічний, первинний пієлонефрит, стадія загострення, функція нирок збережена".

Дитина госпіталізована зі скаргами на підвищення температури тіла до 37,3, загальну слабкість, біль в поперековій ділянці, порушення сну.

З анамнезу відомо, що у дитини з 1 місяця життя з'явилися прояви дисбактеріозу кишечника. З 6-місячного віку часто лікувалася з приводу вульвіту. У віці 2,7 років вперше спеціалізовано обстежена в педіатричному відділенні № 2, встановлено діагноз: "Гострий пієлонефрит, активна стадія, функція нирок збережена". Загострення захворювання відзначаються не менше 5 разів на рік, завжди після перенесеної ГРВІ, що супроводжуються змінами в аналізах сечі (виражена лейкоцитурія, незначна протеїнурія, бактерійурія), вираженою загальною слабкістю. При черговому стаціонарному лікуванні була проведена мікційна цистографія - ознак міхурово-сечовідного рефлексу не виявлено. Обстеження на TORCH-інфекції не проводилось. За період хвороби використані всі антибактеріальні препарати першого ряду, та більшість альтернативних. Як протирецидивне лікування отримувала фурумаг в дозі 25 мг на ніч протягом 2 міс.

З анамнезу життя відомо, що народилася від першої вагітності з раннім гестозом, загрозою переривання в 24-27 тижнів, ФІШ, безсимптомною бактеріурією. З сімейного анамнезу відомо, що у матері цистит в анамнезі, у дідуса по материнській лінії - хронічний пієлонефрит.

На даний час у хворої виявлено супутню патологію - вульвіт, ГРВІ реконвалісцент. Згідно з критеріями активності ПН у хворої визначено I ступінь активності (субфібрилітет, незначно виражена інтоксикація, лейкоцити -  $5,3 \cdot 10^9/\text{л}$ , ШОЕ - 5 мм/год., СРБ до 6 мг/л). В загальному аналізі сечі при госпіталізації - лейкоцитурія на 2/3 поля зору, бактерійурія (++) . В аналізі сечі за Нечипоренко визначалась лейкоцитурія 135 000/мл. При бактеріологічному дослідженні сечі виділено 100 тис. КУО *Escherichia coli*, не чутливої до амоксициліну, ампіциліну, цефтріаксону, цефотаксиму, амікацину, фурумагу, чутливої до норфлуксацину та фосфоміцину. Мазок з піхви: лейкоцити 20-30 в препараті, мікрофлора коки. За даними полімеразної ланцюгової реакції (матеріал дослідження - зішкріб епітеліальних клітин із уретри): *Chlamidia trachomatis* - не виявлена, *Ureaplasma ureolyticum* - виявлена, *Mycoplasma hominis* - виявлена.

Отримані клініко-генеологічні дані були занесені в шкалу тяжкості нефропатології щодо ризику реалізації рецидивуючого перебігу ХП: спадковість: по материнській лінії - 2 бала, нефрологічні захворювання у матері - 1, нефрологічні захворювання у діда - 0,5, ускладнений перебіг вагітності - 0,5, бактерійурія під час вагітності - 1; супутня патологія: вульвіт - 1, вади СВС - 0, часті епізоди ГРВІ - 2 бала відповідно; оцінка мікробного пейзажу сечі: (за результатом бактеріологічного посіву сечі та ПЛР зішкріба епітеліальних клітин із уретри): виділення кишкової палички при бакпосіві сечі  $\geq 10^5$  КУО/мл - 2, визначення *Mycoplasma*-1, *Ureaplasma*-1, мікст-інфекція - 1,5; лабораторні критерії: лейкоцитурія 135 тис./мл - 1, лейкоцити -  $5,3 \cdot 10^9/\text{л}$  - 0,5 балів. Сума балів по шкалі тяжкості нефропатології відповідно становить 15 балів. Дитині призначено дослідження геномної ДНК для виявлення поліморфних ділянок Asp299Gly TLR4.

У результаті рестрикції у хворого визначено одонуклеотидний поліморфізм Toll-подібного рецептора 4 Asp299Gly (GG/GG - гомозигота мутантного типу), наявність якого визначає рецидивуючий, хвилеподібний перебіг ХП зі стійкою бактерійурією резистентною до основних антибактеріальних препаратів та підвищеною чутливістю до *Mycoplasma hominis* та *Ureaplasma ureolyticum*.

Запропонованим способом в умовах педіатричного відділення № 2 Полтавської обласної дитячої клінічної лікарні було обстежено 60 дітей хворих на хронічний пієлонефрит в період загострення. Доцільність запропонованого методу обумовлена високою достовірністю, малоінвазивністю, безпечністю у застосуванні.

Запропонований спосіб дозволяє не тільки проводити дослідження в сім'ях дітей хворих на ПН, але й може бути використаним як скринінговий метод стосовно осіб із функціональними маркерами інфекції сечової системи.

Позивний ефект полягає в оптимізації прогнозування рецидивуючого перебігу ХП, можливості вчасного превентивного лікування і використання комплексної профілактики захворювання у дітей, що, в свою чергу, підвищить медичну допомогу дітям та позитивно позначиться на показниках якості життя дітей.

5

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб прогнозування рецидивуючого перебігу хронічного пієлонефриту у дітей, що включає дослідження крові зі застосування полімеразної ланцюгової реакції, який **відрізняється** тим, що розраховують за шкалою критеріїв тяжкості нефрологічної патології ступінь ризику реалізації рецидивуючого перебігу ХП у дітей, шляхом присвоєння кожному критерію оцінки від 0 до 2 балів, внесення показників до розробленої таблиці, обробки і систематизації отриманих результатів, низькому ступеню ризику відповідає оцінка від 0 до 5 балів, середньому ступеню 5-10 балів, високому - більше 10 балів, додатково, дітям із високим ступенем ризику, проводять визначення в крові одиничного нуклеотидного поліморфізму Asp299Gly гена Toll-подібного рецептора 4, виявлення алеля G TLR4 підтверджує та асоціюється з рецидивуючим перебігом хронічного пієлонефриту у дітей зі схильністю до стійкої бактерійурії та підвищеною чутливістю до основних внутрішньоклітинних збудників (*Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma ureolyticum*).

10

15

---

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

---

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