



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **89991** (13) **U**

(51) МПК (2014.01)

G01N 30/00

G01N 33/48 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2013 13624**
(22) Дата подання заявки: **25.11.2013**
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **12.05.2014**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **12.05.2014, Бюл.№ 9**

(72) Винахідник(и):
Анцупова Віта Вячеславівна (UA),
Бойченко Ольга Василівна (UA),
Бойченко Павло Костянтинович (UA)
(73) Власник(и):
Анцупова Віта Вячеславівна,
вул. Цимлянська, 10, м. Луганськ, 91033 (UA),
Бойченко Ольга Василівна,
вул. Оборонна, 18, кв. 42, м. Луганськ, 91031 (UA),
Бойченко Павло Костянтинович,
вул. Новопромишленна, 10, кв. 7, м. Луганськ, 91033 (UA)

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ ВТОРИННИХ ПОРУШЕНЬ МЕТАБОЛІЗМУ ВУГЛЕВОДІВ В ГАСТРОЕНТЕРОЛОГІЧНІЙ ПРАКТИЦІ

(57) Реферат:

Спосіб діагностики вторинних порушень метаболізму вуглеводів в гастроентерологічній практиці включає визначення вуглеводів у біосубстраті сечі.

UA 89991 U

Корисна модель належить до галузі медицини, а саме до гастроентерології.

Актуальність предмету корисної моделі пов'язана зі значною поширеністю хвороб обміну речовин у людей, причому особливо - вуглеводів. Зокрема порушенням перетравлення та всмоктування компонентів їжі в кишечнику (синдромами мальабсорбції та мальдигестії) супроводжується ціла група захворювань, в основі розвитку яких лежить спадково обумовлена (первинна) або вторинна недостатність ферментів. Первинні порушення метаболізму вуглеводів - це моногенні орфанні захворювання, які проявляються ще у дитячому віці та обумовлені зниженням активності ферментів, як правило, в непошкоджених ентероцитах щіткової облямівки кишечника (фруктоземія, галактоземія, первинна лактазна недостатність). Вторинне порушення метаболізму вуглеводів широко поширене у осіб різного віку і патогенетично зв'язано з пошкодженням ентероцитів на фоні цілої низки захворювань шлунково-кишкового тракту (ШКТ). Відомо, що пошкодження ентероциту можливо при інфекційному, імунно-запальному процесах в кишечнику, при гострих і хронічних захворюваннях шлунково-кишкового тракту; після операційних втручань, зокрема на тонкій кишці; захворювань органів ендокринної системи; прийому деяких лікарських препаратів та опромінювання; при незбалансованому харчуванні: дефіциті білка, вітамінів і мікроелементів у раціоні; токсичній дії деяких природних компонентів їжі або забруднюючих її чужорідних домішок. Всі ці чинники можуть привести до атрофічних змін слизової кишечника і недостатньої активності ферментів, що розщеплюють вуглеводи. При лікуванні основного захворювання досить часто не звертають уваги на порушення всмоктування вуглеводів при запальних станах ШКТ, що особливо важливо при підборі індивідуальної дієти. У цьому випадку, у результаті вторинного ураження слизової оболонки кишечника можна очікувати й проникнення в кров моносахаридів та нерозщеплених дисахаридів, які не включаються до фізіологічного метаболізму. Відомо ж, що останні фільтруються у нирках, але не реабсорбуються й потрапляють у сечу (вторинну, кінцеву). Тому важливими є спроби розробок способів визначення вторинних порушень метаболізму моносахаридів та розщеплення дисахаридів у більш зручних в естетичному відношенні для пацієнта й дослідника біосубстратах, які надають можливість виявити всю групу вуглеводів, у яких на даний момент має місце порушення обміну.

Традиційним субстратом для виявлення вторинних порушень перетравлення та всмоктування вуглеводів є кал. Існують методики досліджування кала на наявність вуглеводів в перерахунку на глюкозу за допомогою проби Бенедикта. Цей метод відображає загальну здатність засвоювати вуглеводи. Зниження ферментів в слизовій оболонці кишечника призводить до зменшення їх розщеплення з подальшим всмоктуванням у вигляді моновуглеводів і збільшення їх кількості в калі у вигляді нерозщеплених дисахаридів. Метод дуже дешевий, але має недоліки. Основне, що затруднює застосування проби Бенедикта є той факт, що в основі цього дослідження має місце реакція, яка дозволяє виявляти присутність як моно- так і дисахаридів, які мають редуруючі властивості (глюкоза, фруктоза, галактоза, лактоза, мальтоза) без ідентифікації окремого вуглеводу. У нормі вміст вуглеводів, які мають редуруючу активність, у калі - незначний. Перевищення референсних значень характеризує як порушення розщеплення, так і всмоктування, що не завжди достатньо для призначення коректного лікування. Крім цього проба Бенедикта може бути позитивною в присутності багатьох ліків, вітамінів та інших речовин і давати до 40 % помилково-позитивних відповідей. У той же час, оскільки вуглеводи в товстій кишці підлягають подальшим перетворенням під дією мікрофлори, їх кількість в калі не може корелювати зі ступенем інгібування синтезу дисахаридаз у слизовій оболонці тонкої кишки, а також ступенем ураження її у разі наявності якихось захворювань органів шлунково-кишкового тракту, у зв'язку з чим діагностична цінність даного біосубстрату стає сумнівною.

Також були запропоновані навантажувальні тести діагностики порушення всмоктування вуглеводів за рівнем їх концентрації у крові (інвазивний метод) та у видихаємому повітрі (неінвазивний метод). За інвазивною методикою визначається рівень концентрації глюкози у крові як кінцевого метаболіту всіх вуглеводів з урахуванням їх метаболізму в печінці. Недостатність всмоктування в кишечнику діагностується по плоскій цукровій кривій при навантаженні з досліджуванням вуглеводом. Перевагою навантажувальних тестів є можливість точного виявлення причини порушення всмоктування - зниження специфічного ферменту в ентероцитах на етапі пристінкового травлення і всмоктування вуглеводів. Однак, для кожного вуглеводу потрібно проводити окрему пробу, що робить процес діагностики незручним і тривалим. Також потрібно враховувати той факт, що на характер глікемічної кривої впливають рівень інсуліну та ступінь його підвищення при збільшенні глюкози в крові. При гіперінсулінізмі або цукровому діабеті результат тестування може бути помилково-позитивним. В західній медицині для діагностики явищ дисбактеріозу та лактозної недостатності широко

застосовується водневий дихальний тест, який заснований на ферментації вуглеводів до водню, метану, коротколанцюгових жирних кислот. Неінвазивність методики, відсутність необхідності взяття крові для дослідження робить цю методику привабливою. Але дисбактеріоз, або відсутність бактерій, ферментуючих досліджуваній вуглевод (наприклад біфідум-бактерій і лактози), посилення перистальтики, запори, збудливість пацієнта, прийом їжі, наявність супутніх захворювань (ендокринних, неврологічних, гострих інфекційних, хвороб шлунково-кишкового тракту та інших) може призвести до хибно-негативного результату. Складність інтерпретації показників концентрації водню у видихуваному повітрі знижують діагностичну значимість тесту. Також застосування дорогої апаратури обмежує широке використання водневого дихального тесту у медичній практиці.

Значною проблемою усіх навантажувальних тестів є низька чутливість методик, тому необхідно приймати всередину досить велику кількість вуглеводів (50 г), це викликає погіршення стану пацієнта з посиленням скарг (больових і диспептичних), що звужує показання для застосування цих тестів.

Золотим стандартом є пряме визначення активності дисахаридаз і моносахаридаз в біоптатах слизової оболонки кишечника, що позбавлене недоліків попередніх методів, але інвазивність методики обмежує її застосування, особливо у дитячому віці. Крім цього отриманий біопсійний матеріал під час ФГС або дуоденального зондування при морфологічному гістологічному дослідженні не дає інформації, так як не існує морфологічних маркерів недостатності всмоктування. Терміни "атрофії", "гіпертрофії", "запальної інфільтрації" відносяться до морфологічної характеристики тканин, а не до ферментів ентероцитів.

Рентгенологічні методи дослідження пропонуються як один з компонентів схеми обстеження, однак не дають інформації про активність дисахаридаз і моносахаридаз.

У зв'язку з цим був запропонований спосіб діагностики порушення всмоктування та перетравлення вуглеводів шляхом встановлення значень рН калових мас, наявності в калі молочної кислоти (метод Уффельманна), глюкози (глюкофан), лактози (метод Мальфатті) [Каган Ю.Д., Шепель М.А. Мальабсорбция углеводов при кишечных инфекциях у детей первого года жизни// Российский вестник перинатологии и педиатрии. - 2001. - № 2. - С. 38-39].

Цей спосіб є неінвазивним та найбільш специфічним з існуючих щодо виявлення глюкози та лактози і тому вибраний як найближчий аналог. До недоліків найближчого аналога належить те, що за його допомогою наявність порушень перетравлення й всмоктування вуглеводів (мальабсорбції) виявляється в середньому лише в 49,5% випадків. При цьому не ідентифікується спектр моносахаридів, для яких порушений фізіологічний метаболізм. Також метод Мальфатті, або Велька-Мальфатті дає позитивну реакцію не тільки на присутність лактози, а й мальтози. Також наявність у біосубстраті вітамінів, деяких лікарських препаратів дають хибно-позитивну реакцію. Крім цього виявлення в калі вищезгаданих вуглеводів і молочної кислоти здійснюється якісними й напівкількісними тестами, що недостатньо для підтвердження кінцевого діагнозу, як це передбачається так званою двоетапною системою дослідження, що отримала розповсюдження в практиці охорони здоров'я. Нарешті, біосубстратом для даного способу є кал, для роботи з яким потрібні окремі матеріальні, санітарні та естетичні умови.

В основу корисної моделі поставлено задачу підвищення ефективності відомого способу діагностики вторинних порушень перетравлення і всмоктування вуглеводів, а саме досягнення одномоментного виявлення найбільш значущих у метаболічному відношенні вуглеводів у біосубстраті, більш зручному в естетичному відношенні як пацієнтам, так і медикам-дослідникам.

Поставлена задача вирішується шляхом застосування методу тонкошарової хроматографії (ТШХ), який дозволяє виявляти водночас увесь спектр вуглеводів, що не повинні бути в нормі в такому біосубстраті як сеча.

Методика визначення вуглеводів у сечі методом планарної тонкошарової хроматографії (ТШХ)

Принцип методу: фізико-хімічне розділення біологічних рідин за допомогою органічних розчинників на складові компоненти.

Реактиви.

1. Система розчинників: а) Н-бутанол; б) льодяна оцтова кислота (ЛОК); в) вода дистильована. Змішують а), б), в) у співвідношенні 3:1:1 відповідно (вся робота з розчинниками проводиться у витяжній шафі).

2. Стандартні розчини вуглеводів: глюкоза 20 мг, ксилоза 20 мг, галактоза 20 мг, лактоза 30 мг, мальтоза 20 мг, фруктоза 20 мг, сахароза 20 мг.

Кожна суміш розчинюється у 10 мл дистильованої води. На хроматографічні пластини наносять 10 мкл кожної стандартної суміші.

5 Спеціальне обладнання: хроматографічні камери; пристрій для нагріву УСП-1М для нанесення проб на хроматографічні пластини; хроматографічні пластини; пульверизатор; мікропіпетки на 5, 10 та 20 мкл.

10 Хід визначення. Нанесення зразків на пластинку і отримання результатів: на пластинці м'яким простим олівцем наносять лінію старту на відстані 1,5 см від нижнього краю довжиною 1,5 см; за кількістю проб, відстань між пробами 0,5 см і лінія фінішу на відстані від лінії старту 10 см; наносять зразок сечі в кількості 10 мкл на розкреслену пластинку підігріту до 80 °С (використовують сечу, зібрану за 12 годин, перед дослідженням сечу центрифугують 10 хвилин на 3000 об/хв або профільтровують); на кожну пластинку, крім біологічного матеріалу, наносимо стандартну суміш вуглеводів або один вуглевод, зразок сечі здорової людини.

15 Разгонка вуглеводів: пластину розташовують в хроматографічну камеру, заповнену системою розчинників так, щоб стартова лінія була вище рівня наливої рідини, камеру закривають, фронту розчинника дають піднятися до фінішної лінії, пластинку виймають і просушують. Розгонку проводимо двічі.

Фарбування вуглеводів: здійснюють дифеніламіновим барвником методом вприскування, користуються пристроєм для фарбування (варіант пульверизатора).

20 Інтерпретація результату. Взаємне розташування цукрів на хроматограмі зазвичай визначають за допомогою коефіцієнта рухливості R_g , що характеризує швидкість міграції кожного цукру щодо міграції глюкози. Ідентифікація цукрів сечі на хроматограмах досягається за допомогою зіставлення їх рухливості з рухливістю відповідних стандартів.

R_g цукрів при одновимірній висхідній хроматографії сечі

Цукровий стандарт	
Рибоза	1,60
Ксилоза	1,40
Фруктоза	1,13
Глюкоза	1,00
Галактоза	0,84
Сахароза	0,44
Лактоза	0,24
Глюкуронова кислота	0,15

25 Норма: У нормі сеча не повинна містити цукру в такій кількості, яка виявлялося б на хроматограмі.

Відомий, з доступних нам джерел інформації, факт накопичення субстратів ферментативних реакцій в крові та сечі є не тільки наслідком зниження синтезу ферментів у клітинах слизової оболонки кишечника, оскільки в даному разі дисахариди не можуть проникати в кров, а і 30 наслідком порушення цілісності згаданих клітин, у результаті чого й з'являється можливість проникнення в кров вуглеводів, які не включаються до фізіологічного метаболізму.

Наша пропозиція щодо застосування методу ТШХ для виявлення більшого спектра вуглеводів, і саме в сечі, базується на отриманих шляхом дослідження даних, які дозволили встановити закономірність, що при низці захворювань і станів, що супроводжуються 35 деструктивними змінами слизової оболонки тонкої кишки не тільки збільшується вміст вуглеводів у калі й продуктів їх перетворень (коротколанцюжкових жирних кислот, молочної кислоти, вуглекислого газу, метану й водню) під дією мікрофлори кишечника й самого калу, а також з'являються вуглеводи в сечі.

40 Заявлений спосіб здійснюють таким чином. Людині з певними скаргами, яка має диспептичні розлади та потребує розробки індивідуальної дієти, за допомогою методу ТШХ виявляють спектр вуглеводів в сечі, яку було зібрано за 12 годин (з 18 вечора до 6 години ранку).

45 При розробці заявленого способу було обстежено групу хворих (39 осіб) гастро-ентерологічного профілю двома методами одночасно: за допомогою способу-найближчого аналога та заявленим способом. Серед обстежених було 10 осіб з функціональними розладами кишечника (СРК), 8 - з гастритом та дуоденітом, 6 - з хронічним панкреатитом, 6 - з ГЕРХ, 5 - з хронічним холециститом, 2-з виразковою хворобою шлунка та дванадцятипалої кишки, 2 - з стеатозом печінки. При проведенні клінічного обстеження було встановлено, що всі хворі мали диспептичні прояви.

При обстеженні пацієнтів методом найближчого аналога (досліджували кал) моносахариди як такі у калі не визначались, маркером порушення всмоктування моносахаридів була наявність глюкози у біосубстраті, яка була ізольовано визначена у 15,4 % хворих. Дисахаридна недостатність (наявність лактози) була виявлена у 48,7 % хворих, з яких у 97,4 % було визначено у калі й глюкозу. Присутність вуглеводів у калі не було встановлено у 25,6 % чоловік. Тобто порушення всмоктування та перетравлення вуглеводів методом найближчого аналога було виявлено в 74,4 % випадках.

При проведенні лабораторного дослідження пацієнтів методом ТШХ вуглеводів сечі було виявлено наявність тільки моносахаридів у 43,6 % хворих. З них ізольована наявність фруктози у сечі виявлена у 5,1 % хворих, пентоз (рибози, ксилози) - у 7,7 % хворих, наявність галактози - у 12,8 % хворих. Порушення всмоктування двох і більше моносахаридів виявлено у 18 % хворих відповідно. Наявність дисахаридів виявлена у 51,3 % хворих, причому у всіх випадках супроводжувалася моносахаридурією. Відповідно ізольованої лактозурії, наявності глюкозурії у обстежених пацієнтів не виявлено. У 5,1 % хворих присутність вуглеводів у сечі не виявлено. Тобто порушення всмоктування та перетравлення вуглеводів нашим методом було виявлено в 94,9 % досліджених.

Отже, відомий спосіб спільно з клінічними даними хоча в цілому й достатній для скринінгу й контролю порушення всмоктування та перетравлення вуглеводів, але не надає повної інформації для індивідуального підбору елімінаційної дієти.

У той же час, заявлений спосіб виявляє увесь спектр наявних у сечі вуглеводів, що може використовуватися в комплексному лікуванні для розробки особистого дієтичного раціону.

Таким чином, отримані дані свідчать, що застосування заявленого способу патогенетично обґрунтоване, оскільки сприяє встановленню наявності порушення всмоктування та перетравлення вуглеводів. Спосіб не вимагає дорогих або дефіцитних приладів і реактивів, не має небажаних або побічних ефектів, а тому може розглядатися як перспективний в плані діагностики вторинних порушень всмоктування та перетравлення вуглеводів в гастроентерологічній практиці.

Наводимо конкретні приклади використання заявленого способу. Хворий М., 34 років, працює економістом. Звернувся до гастроентеролога зі скаргами на нестійкі випорожнення, болі в кишечнику, відрижку повітрям. Хворіє протягом останнього року на СРК.

При лабораторному обстеженні методом найближчого аналога виявлено наявність лактози та глюкози. При обстеженні заявленим методом встановлено наявність фруктози, галактози та лактози. Було призначено комплексне лікування, до якого було включено елімінаційну дієту. Після проведеного лікування у пацієнта зникли скарги. Об'єктивно ТШХ вуглеводів сечі відповідає нормі.

Хвора Ц., 31 року, працює медсестрою. Звернулася до гастроентеролога зі скаргами на болі переймоподібного характеру в животі, рідкі випорожнення, 2-3 рази у ранці, відчуття неповного випорожнення кишечника. Хворіє протягом останнього півроку.

При лабораторному обстеженні методом найближчого аналога виявлено наявність глюкози. При обстеженні заявленим методом встановлено наявність фруктози та галактози. Було призначено комплексне лікування, до якого було включено елімінаційну дієту. Після проведеного лікування у пацієнта зникли скарги. Об'єктивно ТШХ вуглеводів сечі відповідає нормі.

Отже, заявлений спосіб діагностики вторинного порушення всмоктування та перетравлення вуглеводів у хворих гастроентерологічного профілю має суттєві переваги відносно найближчого аналога, оскільки він сприяє більш об'єктивному виявленню наявності конкретних вуглеводів. Крім цього заявлений спосіб доступний, а тому може бути рекомендований для широкого використання в лабораторній практиці.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

1. Спосіб діагностики вторинних порушень метаболізму вуглеводів в гастроентерологічній практиці, що включає визначення вуглеводів в біосубстраті, який **відрізняється** тим, що як біосубстрат використовують сечу.

2. Спосіб діагностики вторинних порушень метаболізму вуглеводів в гастроентерологічній практиці за п. 1, який **відрізняється** тим, що для визначення вуглеводів використовують метод тонкошарової хроматографії.

3. Спосіб діагностики вторинних порушень метаболізму вуглеводів в гастроентерологічній практиці за п. 1, який **відрізняється** тим, що визначається увесь спектр вуглеводів з порушенням метаболізмом.

Комп'ютерна верстка О. Рябо

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