

Винахід відноситься до медицини, а саме до нефрології, і може бути використаним для оцінки прогресування діабетичної нефропатії.

Діабетична нефропатія (ДН) - це специфічне ураження нирок при цукровому діабеті, обумовлене сполученою дією численних факторів (генетичних, метаболічних, імунологічних та гемодинамічних), яке характеризується розвитком вузликowego чи дифузного гломерулосклерозу. Під поняттям діабетична нефропатія слід розуміти окрему нозологічну одиницю патології нирок, притаманну тільки цукровому діабету, як один із проявів діабетичної мікроангіопатії. Діабетичний гломерулосклероз, зважаючи на результати дослідження стадійності пато- і морфогенезу ДН, справді слід вважати кінцевою стадією цього ускладнення цукрового діабету.

Діабетична нефропатія розвивається, як правило, через 10-15 років після початку цукрового діабету й надто швидко призводить до розвитку хронічної ниркової недостатності. Близько 40% пацієнтів, захворівших в дитинстві, гинуть від ниркової недостатності, не досягаючи 30-40-літнього віку [Піріг Л. А. Цукровий діабет і нирки. // Журнал практичного лікаря. -1999. - №5. - С.11-14].

На сьогоднішній день лабораторна діагностика стадій діабетичної нефропатії є найбільш точною та включає: виявлення критеріїв ураження клубочків [Перцева Н. О. Діабетична нефропатія. // Урологія, 2000. - №1. - С.104-108], розпізнавання каналцевих дисфункцій [Ракова Н. Г. Патогенез и лабораторная диагностика диабетической нефропатии (обзор литературы). // Клиническая лабораторная диагностика. - 1998. - №5. - С.3-9], вивчення загальних маркерів мікроангіосклерозу цукрового діабету. З метою раннього виявлення ДН рекомендують дослідження ниркової гемодинаміки методом динамічної реносцинтиграфії [Тареева И. Е., Мухин Н. А., Шестакова М.В. Диабетическая нефропатия: Нефрология. Руководство для врачей. / Под общей ред. Тареевой И.Е. - М.: Медицина, 2000. - С.448-454] та радіонуклідної ангіографії [Шестакова М. В. Поражение почек при сахарном диабете: диагностика, профилактика и лечение. // Русский медицинский журнал. - 1998. - №12. - С.785-787] з встановленням зменшення швидкості ниркового кровотоку, зниження відносного венозного об'єму крові, пробу з фізичним навантаженням для встановлення прихованої мікроальбумінурії, пробу з індометацином з визначенням адекватності реакції збоку швидкості клубочкової фільтрації [Шестакова М.В. Поражение почек при сахарном диабете: диагностика, профилактика и лечение. // Русский медицинский журнал. - 1998. - №12. - С.785-787].

Єдиним загальноновизнаним маркером ураження клубочків при цукровому діабеті служить мікропротеїнурія. Її виявлення в хворих на цукровий діабет при фізичному навантаженні є першим симптомом процесу.

Тому надійним критерієм доклінічної стадії діабетичної нефропатії є мікроальбумінурія. Під цим терміном мають на увазі екскрецію альбуміну з сечею від 30 до 300мг/добу, яка підтверджена в 2 з 3 аналізів сечі протягом 6 місяців [Добронравов В.А. Клинические факторы, связанные с развитием микроальбуминурии у больных сахарным диабетом I типа. // Нефрология. -1998. - Т.2. - №3. - С.63-66].

Мікроальбумінурія, яка перевищує допустимі нормальні значення, але не досягає ступеню протеїнурії, є лабораторним показником, який дозволяє визначити доклінічні стадії діабетичної нефропатії. Для цього використовують імуноферментну тест-систему для визначення концентрації альбуміну в сечі людини ("Альбумін – ІФА"). Принцип методу оснований на виявленні в сечі людини сироваткового альбуміну за допомогою специфічного антиальбумінового кон'югату (анти-ЧСА). Компоненти, що не зв'язалися, відмиваються, а активність ферменту в складі імунних комплексів визначають з допомогою субстрат – хромогенної суміші. Інтенсивність профарбування хромогену зворотно пропорційна концентрації альбуміну в зразку. Досліджуваний матеріал: з добової сечі, зібраної по Нечипоренко, відбирають 1мл. Зберігають зразки не більше 24 годин при +2+8°С. Довгострокове зберігання допускається в замороженому вигляді при температурі -20°С. Повторні заморозка та розтавання не рекомендуються. До складу набору входять: планшет поліістероловий з іммобілізованим антигеном, калібратори, буфер фосфатно-сольовий (ФСБ), цитратно-фосфатний буфер (ЦФБ), розчин субстрату, кон'югат, зупиняючий розчин. Оцінка результатів дослідження: міряють оптичну щільність (ОЩ) в усіх ямках. Визначають кількість альбуміну в досліджуваних зразках по графіку, побудованому по калібровочним зразкам. В нормі екскреція альбуміну не перевищує 30мг за добу, що відповідає 20мг/л. Діапазоном для мікроальбумінурії є екскреція альбуміну від 30 до 300мг/доб. У випадках, коли екскреція з сечею альбуміну перевищує 300мг/доб, говорять про протеїнурію, що свідчить про прогресування діабетичної нефропатії.

У пацієнтів з мікроальбумінурією високий ризик розвитку макроальбумінурії і, врешті-решт, термінальної стадії ниркової недостатності. Мікроальбумінурія є провісником діабетичної нефропатії, а також створює умови для розвитку проліферативної ретинопатії, нейропатії та серцево-судинних захворювань, зумовлених діабетом. Поява в хворого на цукровий діабет мікроальбумінурії свідчить про швидкий розвиток (у найближчі 5-7 років) стадії явної діабетичної нефропатії. Мікроальбумінурія - єдиний нині критерій діагностики доклінічної стадії діабетичної нефропатії [Інструкція по використанню тест-системи імуноферментної для визначення концентрації альбуміну в сечі людини ("Альбумін-ІФА"). - Державний реєстраційний номер №1247/2002. - ТОВ НВЛ "Гранум", м.Харків].

Даний спосіб оцінки прогресування діабетичної нефропатії є найбільш близьким до того, що заявляється по технічній суті та результату, який може бути досягнутим, тому його обрано в якості прототипа.

Основним недоліком способу прототипу є те, що по показникам мікроальбумінурії можна оцінити тільки стан клубочкового апарату нирок, що в свою чергу, не дає певного представлення про функціональний стан всього нефрону, тобто і каналцевого апарату.

У зв'язку з вищевикладеним в основу винаходу покладено задачу - підвищення точності оцінки прогресування діабетичної нефропатії.

Задача, яка покладена в основу винаходу вирішується тим, що в відомому способі оцінки прогресування діабетичної нефропатії, який включає визначення показників мікроальбумінурії, відповідно до винаходу, додатково визначають β_2 -мікроглобулін, і якщо показники мікроальбумінурії, в середньому, зростають на 15% і більше, а показники β_2 -мікроглобуліну на 5% і більше, в порівнянні з попередніми, визначають прогресування діабетичної нефропатії.

Позитивний ефект винаходу обумовлений тим, що одночасно оцінюють показника стану клубочкового і каналцевого апарату нефрону, що дає змогу оцінити ці зміни ще на доклінічній стадії [Дедов И. И., Шестакова М. В. Диабетическая нефропатия. - М.: Универсум Пабблишинг, 2000. - 240с.].

Спосіб виконують наступним чином: одночасно з визначенням мікроальбумінурії по способу прототипу у тій же пробі сечі визначають β_2 -мікроглобулін.

Для визначення змісту β_2 -мікроглобуліну використовувався метод непрямого твердофазного імуноферментного аналізу (ІФА-ELISA). Визначення бета-2-мікроглобуліну в сироватці або плазмі є допоміжним у клінічному визначенні целюлярної імунної системи та онкомаркером. Значення бета-2-мікроглобуліну в сечі показує порушення ниркової фільтрації. Формат набору: поділюваний мікроплашкет, що складається з 12 стрипів по 8 осередків кожний, покритих високоочищеними антитілами до бета-2-мікроглобуліну (кролячого, поліклональними); калібратори β_2 -мікроглобуліну в буфері; контролі β_2 -мікроглобуліну в буфері; буфер зразків (жовтий концентрат); розчин ферментного кон'югату (блідо-червоний), що містить поліклональні кролячі анти-чоловечьї бета-2-мікроглобулінові Ig, мічені пероксидазою хрону; розчин субстрату ТМБ; стоп-розчин (1М соляна кислота); буферний промивний розчин (концентрат). Матеріал зразка: сеча, сироватка або плазма.

Принцип методу і постановка реакції: він розроблений для кількісного виміру β_2 -мікроглобуліну в зразках людської сечі, сироватки або плазми. Мікроосередки покриті високоочищеними анти-чоловічими антитілами до бета-2-мікроглобуліну. Плашка може бути розділена на 12 стрипів по 8 осередків кожен або може бути використана відразу для 96 визначень. Кожен осередок може бути відділен від стрипу ("break-away").

Нормальний діапазон β_2 -мікроглобуліну в зразках сечі і сироватки/плазми у здорових осіб (для кожного визначеного набору окремо):

- проби сечі: 0-0,3 $\mu\text{г/мол}$.

- зразки сироватки або плазми: 0-3,0 $\mu\text{г/мол}$.

Дослідження проб проходить в дублях. Високі показники розведуть буфером. Результати показали лінійність у всьому вимірюваному діапазоні. Коефіцієнт варіації (CV) не перевищував 5%, а це говорить про те, що вірогідність даного дослідження висока [Бета-2-микроглобулин -иммуноферментный набор для количественного определения бета-2-микроглобулина в моче или сыворотке. - Кат. №411-5005 (ORG 5BM). - БИОХИММАК].

Ефективність даного способу підтверджується клінічним прикладом:

Хворий К., 71р. (1932р.н.), поступив в ендокринологічне відділення ХОКЛ 25.03.2003р. з скаргами на головний біль, набряки гомілок ніжних кінцівок, спрагу, сухість в роті, зниження маси тіла, слабкість. В анамнезі: хворіє цукровим діабетом 20 років, приймає сахарознижачі препарати. Хворому були зроблені загальні клініко-лабораторні дослідження: клінічний та біохімічний аналізи крові (глікемія - підвищення вмісту глюкози в крові до 11ммоль/л), клінічний аналіз сечі та аналіз добового діурезу (добовий діурез склав 2л/за добу), азотемічні показники крові (креатинін та сечовина) у межах фізіологічної норми. Встановлено діагноз: цукровий діабет II типу, ХИН (хронічна ниркова недостатність) 0 ступеню. З метою подальшого розвитку захворювання, хворому було додатково було проведено дослідження вмісту мікроальбуміну (0,675 $\mu\text{г/мл}$ при нормі 0-0,3 $\mu\text{г/мл}$) та β_2 -мікроглобуліну (2,2 $\mu\text{г/мл}$ при нормі 0-25 $\mu\text{г/мл}$) в сечі. Проведені дослідження показали подальше погіршення даного захворювання, у зв'язку з чим хворий у вересні поточного року був повторно госпіталізован в спеціалізоване відділення.

Таким чином винахід ілюструє надійність доклінічного критерію ураження ниркових клубочків шляхом оцінки мікроальбумінурії, підвищення рівня якої в пробі сечі хворого свідчить про ступінь порушення функціонального стану ниркових клубочків, а підвищення екскреції β_2 -мікроглобуліну з сечею у осіб, в яких відсутня протеїнурія, свідчить про порушення процесу канальцевої реабсорбції.