



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 4018

(13) U

(51) 7 G01N33/48

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ИНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ ТИПУ ПОРУШЕНЬ ЛІПІДНОГО МЕТАБОЛІЗМУ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТ

1

2

(21) 20040503810

(22) 20.05.2004

(24) 15.12.2004

(46) 15.12.2004, Бюл. № 12, 2004 р.

(72) Никула Тарас Денисович, Мойсеєнко Валентина Олексіївна, Брюзгіна Тетяна Семенівна, Парafenko Ольга Іванівна

(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. О.О.БОГОМОЛЬЦЯ (НМУ)

(57) Спосіб оцінки типу порушень ліпідного метаболізму у хворих на хронічний гломерулонефрит, що включає визначення жирнокислотного спектра сироватки крові методом газорідної хроматографії, який **відрізняється** тим, що за жирнокис-

лотним спектром сироватки крові розраховують суму вмісту насичених жирних кислот, суму вмісту ненасичених жирних кислот сироватки крові хворих та їх співвідношення за формулою:

$$K = \frac{\text{Сума насичених жирних кислот}}{\text{Сума ненасичених жирних кислот}}, \text{ при зни-}$$

женні коефіцієнта К по відношенню до контролю визначають порушення ліпідного метаболізму за циклооксигеназним типом, а при збільшенні - порушення ліпідного метаболізму за ліпооксигеназним типом.

Корисна модель відноситься до медицини, а саме до терапії, точніше - до ліпідології, і може бути використана у практичній медицині для об'єктивізації оцінки порушень ліпідного метаболізму у хворих на хронічний гломерулонефрит (ХГН) та корекції виявлених змін для підвищення ефективності лікування.

Хронічний гломерулонефрит - це хвороба переважно осіб молодого працездатного віку. Актуальність вивчення даної патології визначається її тяжкістю, негативним впливом на гомеостаз організму людини, на функціонування всіх органів і систем, що, в свою чергу, призводить до виникнення та прогресування хронічної ниркової недостатності, розвитку ускладнень, необхідності проведення замісної терапії, гемо- та перитонеально-го діалізу, трансплантації нирки [1].

Порушення ліпідного обміну розглядаються як фактор ураження нефрона безпосередньо високими концентраціями ліпопротеїдів та посиленням перекисного окислення ліпідів внаслідок підвищення концентрації субстрату окислення. Активізація процесів перекисного окислення ліпідів порушує рівновагу між прооксидантною та антиоксидантною системами, що призводить до прогресування хронічної ниркової недостатності. Таким чином, для діагностики стану хворого на ХГН важливою є оцінка порушень ліпідного метаболізму, а

саме, визначення типу цих порушень. Так, при порушенні за циклооксигеназним типом відмічається активація перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) за рахунок зростання ненасиченості ліпідного комплексу: зменшення вмісту пальмітинової кислоти при зростанні рівня поліненасичених жирних кислот, тобто відбувається порушення метаболізму есенціальних жирних кислот на етапі утворення ейкозаноїдів і для зменшення активності ПОЛ стандартне призначення антиоксидантів недовільне. Тоді як при порушенні ліпідного метаболізму за ліпооксигеназним типом процес пероксидації призводить до збільшення насиченості ліпідного комплексу за рахунок зростання вмісту міриксинової кислоти на фоні незмінного рівня поліненасичених жирних кислот і призначення антиоксидантної терапії призводить до нормалізації показників ліпідного обміну. Існує багато способів оцінки порушень ліпідного обміну у хворих на ХГН, які включають визначення рівнів тригліцеридів, загального холестерину, ліпопротеїдів низької щільності, ліпопротеїдів високої щільності, аполіпопротеїну-В, неетерифікованих жирних кислот [2]. Однак вказані способи потребують тривалого виконання, незручні у використанні, не дають можливості визначення типу порушень ліпідного метаболізму.

(13) U

(11) 4018

(19) UA

Найбільш близьким за технічним рішенням до способу, що заявляється, є спосіб оцінки ліпідних порушень, що включає дослідження жирнокислотного складу ліпідів: ліпопротеїдів низької щільності (ЛПНЩ) та ліпопротеїдів високої щільності (ЛПВЩ) сироватки крові. Методом газорідинної хроматографії визначають склад есенціальних жирних кислот: лінолевої та арахідонової, розраховують їх співвідношення по відношенню до контролю за формулою: $k = C_{18:2} / C_{20:4}$ де k - коефіцієнт, $C_{18:2}$ - лінолева кислота, $C_{20:4}$ - арахідонова кислота, і при зниженні отриманих показників ($k < 5-6$) визначають ліпідні порушення [3].

Недоліками вказаного способу є визначення вмісту лише двох жирних кислот, а не більш широкого спектру; неможливість розмежування типів порушень ліпідного метаболізму, тобто неточність оцінки порушень обміну ліпідів.

Задача корисної моделі - вдосконалення диференціації типу порушень ліпідного обміну у хворих на хронічний гломерулонефрит за рахунок використання більш інформативного показника, який використовується специфічно у нефрологічних хворих для розмежування типів порушень ліпідного метаболізму та підвищення ефективності їх лікування за рахунок своєчасної корекції призначення лікарських засобів.

Технічний результат - збільшення точності оцінки типу порушень ліпідного обміну у хворих на ХГН.

Поставлена задача вирішується тим, що у відомому способі оцінки типу порушень ліпідного метаболізму у хворих на хронічний гломерулонефрит, що включає визначення жирнокислотного спектру сироватки крові методом газорідинної хроматографії, згідно корисній моделі, за жирнокислотним спектром сироватки крові розраховують суму вмісту насичених жирних кислот, суму ненасичених жирних кислот та їх співвідношення та при зниженні коефіцієнта K по відношенню до контролю визначають порушення ліпідного обміну за циклооксигеназним типом, а при збільшенні - за ліпооксигеназним типом.

Відмінною особливістю способу, що заявляється, є використання для диференціації типу порушень ліпідного обміну у хворих на ХГН більш специфічного показника, яким є відношення суми насичених жирних кислот до суми ненасичених жирних кислот. Це забезпечує збільшення точності оцінки типу порушень ліпідного метаболізму і, відповідно, призначення більш коректної терапії. Такий спосіб оцінки порушень ліпідного метаболізму невідомий.

Спосіб оцінки типу порушень ліпідного метаболізму, що заявляється, здійснюють таким чином: у хворого на ХГН натще беруть з ліктьової вени кров, виділяють сироватку, 0,5-1,0мл якої поміщають в пробірку з притертою пробкою ємністю 10мл, додають 5-7мл хлороформнометанольної суміші (у співвідношенні 2:1) і тримають 30 хвилин у холодильнику. Для кращого розділення фаз додають 1мл дистильованої води. Для аналізу відбирають хлороформну нижню фазу, яка містить ліпіди. Хлороформні екстракти випарюють досуху в потоці азоту при температурі 45°C на водяній бані. Сухий осад ліпідів об'єднують з 5мл розчину

1% сірчаної кислоти (H_2SO_4) у метанолі і вміщують в ампули, які запаюють. Потім проводять гідроліз і метилювання в термостаті при температурі 85°C протягом 20 хвилин. Екстракцію метилюваних ЖК проводять двічі гексан-ефірною сумішшю (співвідношення 1:1) об'ємом 5мл. Об'єднані екстракти випарюють в потоці азоту при 40°C на водяній бані, сухий осад розчиняють в 40,0-50,0мл чистого гексану і вводять у випарювач хроматографа в об'ємі 5мл. Потім проводять газорідинний аналіз жирнокислотного складу ліпідів на газовому хроматографі (наприклад, "Цвет-500") в ізотермічному режимі з полум'яно-йонізаційним детектором за наступних умов: для визначення спектру жирних кислот (ЖК) ліпідів використовують скляну колонку (розміром 2см×0,3см), яка заповнена фазою 5% ПЕГС на хроматоні N-AW-HMDS (зерніння 0,125-0,160мм), температура колонки 180°C, температура випарювача 240°C, розходження азоту і водню 35мл/хв, повітря - 200мл/хв, швидкість діаграмної стрічки 240мм/год, чутливість шкали $10^{-7}A$, об'єм проби, що вводиться, 3-5мл, тривалість аналізу - 20 хвилин. Кількісну оцінку спектра жирних кислот ліпідів проводять за методом нормування площин і визначають долі кислот у відсотках (%) [4]. Для визначення контрольних показників використовують групу обстежуваних, стандартизовану за діагнозом, віком, статтю з досліджуваною. Статистичну обробку даних проводять з використанням комп'ютерних програм Microsoft Excel 7.0, "Statistica" V. 4.5, SPSS V. 6.1 (США). Контрольні показники становлять $C_{14:0}$ - 0; $C_{16:0}$ - $41,9 \pm 0,9$; $C_{18:0}$ - $15,1 \pm 1,1$; $C_{18:1}$ - $24,2 \pm 0,6$; $C_{18:2}$ - $16,0 \pm 1,4$; $C_{20:3}$ - сліди; $C_{20:4}$ - $2,8 \pm 0,3$; Σ насичених ЖК - $57,0 \pm 1,3$; Σ ненасичених ЖК - $43,0 \pm 1,3$; Σ поліненасичених ЖК - $18,8 \pm 1,4$; K - 1,3. Порушення ліпідного метаболізму за ліпооксигеназним типом визначають при збільшенні коефіцієнта K по відношенню до контролю: збільшення суми насичених ЖК за рахунок достовірного зростання міриксинової кислоти, при незмінному рівні поліненасичених ЖК (ПНЖК) (тенденція до зростання лінолевої ЖК при достовірному зниженні вмісту арахідонової ЖК) тобто відмічають зростання насиченості ліпідного комплексу. Порушення обміну ліпідів за циклооксигеназним типом визначають при зменшенні коефіцієнта K по відношенню до контролю: за рахунок достовірного зростання рівня ПНЖК (зростання вмісту як лінолевої ЖК, арахідонової ЖК) при зниженні вмісту пальмітинової ЖК, тобто відмічають зростання ненасиченості ліпідного комплексу.

Суть корисної моделі пояснюється конкретними прикладами застосування способу.

Приклад 1. Хвора С., 56 років, історія хвороби №2361 23.09.2003р., поступив зі скаргами на головний біль в потиличній ділянці, періодично запаморочення. Діагноз: хронічний гломерулонефрит, аннефротична форма, активність 2 ступеня, хронічна ниркова недостатність ОБ (за класифікацією Т.Д. Никули, 2001р.). Стабільна ренопаренхімна артеріальна гіпертензія. Хворіє на хронічний гломерулонефрит впродовж 8 років. Артеріальна гіпертензія - останні 3 роки. Неодноразово лікувалась амбулаторно та в стаціонарі.

Приймала антагоністи кальцію (амлодипін 5мг/добу) та діуретики (фуросемід по 40мг 2 рази на тиждень). При дослідженні жирнокислотного спектру сироватки крові заявленим способом виявлені наступні зміни: $C_{14:0}$ - 15,0; $C_{16:0}$ - 34,2; $C_{18:0}$ - 10,9; $C_{18:1}$ - 16,9; $C_{18:2}$ - 20,9; $C_{20:3}$ - 0,5; $C_{20:4}$ - 2,2; Σ насичених ЖК - 60,1; Σ ненасичених ЖК - 39,9; Σ поліненасичених ЖК - 23,6; К - 1,5; що свідчить про порушення ліпідного метаболізму за ліпооксигеназним типом. Рекомендовано призначення антиоксидантної терапії. Внаслідок лікування досягнуто покращення багатьох клініко-лабораторних показників.

Приклад 2. Хворий Ш., 52р., історія хвороби №4458 30.08.2003р., поступив зі скаргами на періодичні головні болі, зниження зору. Клінічний діагноз: хронічний гломерулонефрит, аннефротична форма, активність 2 ступеня, хронічна ниркова недостатність ІІБ (за класифікацією Т.Д. Никули, 2001р.). Стабільна ренопаренхімна артеріальна гіпертензія. Хворіє на хронічний гломерулонефрит впродовж 15 років. Артеріальна гіпертензія - останні 5 років. Неодноразово лікувався амбулаторно та в стаціонарі.

Приймав еналаприл по 10мг/добу при різких підйомах артеріального тиску. При дослідженні жирнокислотного спектру сироватки крові заявленим способом виявлені наступні зміни: $C_{14:0}$ - 6,2; $C_{16:0}$ - 29,8; $C_{18:0}$ - 10,3; $C_{18:1}$ - 17,7; $C_{18:2}$ - 32,1; $C_{20:3}$ - 0,5; $C_{20:4}$ - 3,4; Σ насичених ЖК - 46,3; Σ ненасичених ЖК - 53,7; Σ поліненасичених ЖК - 36,0; К - 0,8; $K_{\text{контролю}}$ - 1,3; що свідчать про порушення ліпідного метаболізму за циклооксигеназному типом. Рекомендовано проведення дезінтоксикаційних заходів. В результаті лікування досягнуто покращення багатьох клініко-лабораторних показників.

За період з березня 2003р. по березень 2004р. в умовах Київського міського нефрологічного центру обстежено 20 хворих, у 7 - виявлені порушення по циклооксигеназному типу, у 13 - по ліпооксигеназному типу. Дана група хворих була обстежена і за методикою прототипу. Отримані наступні результати: контрольні показники становлять Σ ПНЖК - $18,8 \pm 1,4$; $C_{18:2}$ - $16,0 \pm 1,4$; $C_{20:4}$ - $2,8 \pm 0,3$, К - 5,7; для групи хворих з виявленими

порушеннями ліпідного метаболізму за ліпооксигеназним типом (n - 13) - Σ ПНЖК - $20,1 \pm 1,5$; $C_{18:2}$ - $17,8 \pm 0,9$; $C_{20:4}$ - $1,8 \pm 0,2$ (p<005 по відношенню до контролю), К - 9,88; для групи хворих з виявленими порушеннями ліпідного метаболізму за циклооксигеназним типом (n - 7) - Σ ПНЖК - $36,2 \pm 1,3$; $C_{18:2}$ - $31,4 \pm 1,8$; $C_{20:4}$ - $4,1 \pm 0,3$ (p<005 по відношенню до контролю), К - 7,65. Наступні спостереження за клінічним перебігом підтвердили більшу точність оцінки порушень ліпідного метаболізму. У 92% за заявленою методикою проти 70% за способом прототипом. Більша точність пояснюється врахуванням змін широкого спектру ЖК, диференціацією типу порушень ліпідного метаболізму. Переваги заявленого методу: чутливість газорідинної хроматографії - 10^{-7} А, висока інформативність, що дозволяє визначити ступінь та напрямок порушень ліпідного метаболізму, зручність у використанні. За допомогою цього методу можна перевірити ліпідні порушення в динаміці, прогнозувати подальший перебіг захворювань, постійно контролювати загальний стан, правильність призначення ліків та ефективність лікування.

Джерела інформації:

1. Никула Т.Д. Хронічна ниркова недостатність. - Київ: За друга, 2001. - С.26-42.
2. Степанова Н.М. Стан прооксидантної і антиоксидантної систем у хворих з хронічною нирковою недостатністю та шляхи його корекції // Ліки України. - 2003. - №3 (68). - С.10-12.
3. Пат. 53533 України, МПК G01N 33/48. Спосіб визначення ліпідних порушень у хворих на ішемічну хворобу серця та гіпертонічну хворобу: О.М. Гиріна, А.В. Глушенко, Т.С. Брюзгіна (Україна); Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця. - №2002075754; Заявл. 12.07.02; Опубл. 15.01.03. - 2с.
4. Гичка С.Г., Брюзгіна Т.С., Вретик Г.М., Рева С.И. Газохроматографический метод определения липидных показателей крови при ишемической болезни сердца // Укр. кард. журнал - 1998. - №7-8 - С.50-52.