



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **17908** (13) **U**  
(51) МПК (2006)  
G01N 33/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ**ОПИС**  
**ДО ПАТЕНТУ**  
**НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**видається під  
відповідальність  
власника  
патенту**(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ СТУПЕНЯ УШКОДЖЕННЯ ТКАНИНИ НИРКИ**

1

2

(21) u200604481

(22) 21.04.2006

(24) 16.10.2006

(46) 16.10.2006, Бюл. № 10, 2006 р.

(72) Стець Олександр Віталійович, Люлько Олексій Олексійович, Бєленічев Ігор Федорович

(73) ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, Стець Олександр Віталійович, Люлько Олексій Олексійович, Бєленічев Ігор Федорович

(57) Спосіб визначення ступеня ушкодження тканини нирки шляхом проведення біохімічного дослідження крові, який **відрізняється** тим, що визначають показники окисної модифікації білка - альдегідфенілгідрозон і карбоксилфенілгідрозон та ступінь дефрагментації білка на великі, середні та мілкі фрагменти, і якщо альдегідфенілгідрозон

складає 0,071-0,110 умовних одиниць (У.О.), карбоксилфенілгідрозон - 0,071-0,110 У.О., великі фрагменти - 0,064-0,070 У.О., середні фрагменти - 0,064-0,070 У.О., мілкі фрагменти - 0,061-0,070 У.О., то діагностують легкий ступінь ушкодження нирки, якщо альдегідфенілгідрозон складає 0,111-0,160 У.О., карбоксилфенілгідрозон - 0,111-0,150 У.О., великі фрагменти - 0,071-0,120 У.О., середні фрагменти - 0,071-0,110 У.О., мілкі фрагменти - 0,071-0,100 У.О., то діагностують середній ступінь ушкодження нирки, якщо альдегідфенілгідрозон складає від 0,161 У.О. та вище, карбоксилфенілгідрозон - від 0,151 У.О. та вище, великі фрагменти - від 0,121 У.О. та вище, середні фрагменти - від 0,111 У.О. та вище, мілкі фрагменти - від 0,101 У.О. та вище, то діагностують тяжкий ступінь ушкодження нирки.

Корисна модель стосується медицини, а саме, урології та нефрології, і може бути використаною в оцінці ступеню ушкодження та термінів відновлення тканини нирки при ушкоджувальній дії запального процесу (пієлонефриту), обструктивного синдрому, механічної травми (у тому числі оперативних та ендоскопічних втручань, дистанційної літотрипсії (ДЛТ)).

Існує багато способів оцінки ступеню ушкодження тканини нирки, але до теперішнього часу не вирішені питання доступного та об'єктивного способу оцінки пошкодження ниркової тканини. За даними літератури, для цієї мети різні автори пропонували сцинтиграфію, комп'ютерну томографію, доплерографію судин нирок, різні біохімічні маркери, такі, як активність нирковоспецифічних ферментів в сечі, продукти перекісного окислення ліпідів, С-реактивний білок та інші. Проте, вказані методи знайшли достатньо обмежене застосування.

Найближчим біохімічним методом є визначення продуктів перекісного окислення ліпідів у сироватці крові: дієнові кон'югати, малоновий діальдегід [Патент №21590 Україна МПК А61В8/00 Спосіб прогнозування ступеню пошкодження ниркової паренхіми при ішемії нирки. №97052043; Заявл.

05.05.1997, Опубл. 30.04.1998 Серняк Ю. П., Рошин Ю.В.].

Спільними суттєвими ознаками прототипу і корисної моделі, що заявляється, є такі: проведення біохімічного дослідження крові.

Визначення концентрації продуктів перекісного окислення ліпідів у сироватці крові, як показала клінічна практика, має ряд недоліків: недостатня чутливість, широкий діапазон коливань отриманих значень, які складно пов'язати з реальним ступенем пошкодження клітини та з інтенсивністю дії чинника, що ушкоджує (на практиці складно визначити діапазон значень норм та градації по ступеню пошкодження).

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалення способу визначення ступеня ушкодження тканини нирки шляхом визначення інших біохімічних показників крові, що забезпечить підвищення достовірності діагностики, зменшення частоти ускладнень, визначення термінів реабілітації органу, що необхідне для визначення безпечних термінів повторної літотрипсії.

В основі корисної моделі стоїть процес, пов'язаний з пошкодженням молекул білків при ушкоджувальній дії активних форм кисню. Глибина пошкодження молекул білків при

(13) **U**  
(11) **17908**  
(19) **UA**

вільнорадикальному окисленню може побічно відображати ступінь пошкодження клітинних структур. Спочатку визначаються різні біохімічні маркери, що відображають ступінь окисної модифікації, потім відбувається руйнування молекули білка на крупні, середні та мілкі фрагменти. Окисна модифікація білків на помисел Дубніной з співавторами - один з ранніх індикаторів пошкодження тканини. Ден і співавтори вважають, що в стані окислювального стресу, активні форми кисню атакують в першу чергу не ліпіди, а білки плазматичних мембран, що приводить до їх деполімеризації та до лізису клітини. Окислені білки часто функціонально неактивні, вони легше піддаються протеолізу, при цьому окислені білки здатні виступати як джерело вільних радикалів, виснажувати запаси клітинних антиоксидантів, таких як аскорбінова кислота та глутатіон. *In vitro* показано, що продукти вільнорадикального окислення білків опосередковують окислювальні пошкодження ДНК. Таким чином, окислені протеїни є не тільки "свідками", але й активними учасниками процесу вільнорадикального пошкодження.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі, який включає проведення біохімічного дослідження крові, новим є те, що визначають показники окисної модифікації білка - альдегідфенілгідразон (АФГ) і карбоксилфенілгідразон (КФГ) та ступінь дефрагментації білка на великі (ВФ), середні (СФ) та мілкі (МФ) фрагменти, і якщо АФГ складає 0,071-0,110 умовних одиниць (У.О.), КФГ - 0,071-0,110 У.О., ВФ - 0,064-0,070 У.О., СФ - 0,064-0,070 У.О., МФ - 0,061-0,070 У.О. то діагностують легку ступінь ушкодження нирки, якщо АФГ складає 0,111-0,160 У.О., КФГ - 0,111-0,150 У.О., ВФ - 0,071-0,120 У.О., СФ - 0,071-0,110 У.О., МФ - 0,071-0,100 У.О. то діагностують середню ступінь ушкодження нирки, якщо АФГ складає від 0,161 У.О. та вище, КФГ - від 0,151 У.О. та вище, ВФ - від 0,121 У.О. та вище, СФ - від 0,111 У.О. та вище, МФ - від 0,101 У.О. та вище, то діагностують тяжку ступінь ушкодження нирки.

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю ознак, що заявляються, та технічним результатом полягає у такому.

При зростанні ступеня пошкодження тканини нирки наголошується не тільки підвищення рівня всіх показників, але змінюється і співвідношення у ряді АФГ - МФ у напрямку зростання останніх. Це зв'язано з тим, що при наростанні ступеня дії ушкоджувальних чинників не тільки залучається більша кількість молекул білка, але і зростає їх ступінь деструкції. При оцінці показників перекисного окислення ліпідів такої залежності не спостерігається. Тому, оцінюючи зміни маркерів всього ряду АФГ - МФ можна більш точно оцінити глибину пошкодження органу.

В урологічній практиці найчастішими причинами які приводять до пошкодження ниркової тканини є: запальний процес (пієлонефрит), обструктивний синдром, механічна травма (у тому числі оперативні і ендоскопічні втручання, дистанційна літотрипсія). Експериментальне встановлено, що для кожного перерахованого ушкоджувального чинника характерні свої особливості зміни ряду АФГ - МФ. Таким чином, можна побічно судити про

переважаючу дію якогось з них. Це дозволить проводити цілеспрямовану профілактику можливих ускладнень: при превалюванні запального процесу - посилення антибактеріальної і протизапальної терапії, урообструкції - дренування сечових шляхів. При оцінці показників перекисного окислення ліпідів специфічність ушкоджувального чинника не виявляється.

У пацієнтів з перенесеними оперативними втручаннями, сеансами ДЛТ, загостреннями хронічних захворювань (наприклад, хронічний пієлонефрит) необхідно визначити з максимальною точністю терміни реабілітації органу. Зокрема це необхідне для визначення безпечних термінів повторної літотрипсії. Встановлено що традиційно вживані в практичній медицині лабораторні і додаткові методи дослідження, не завжди точно відображають реальну картину. Так при нормалізації загального аналізу сечі показники окисної модифікації і ступеня дефрагментації білка можуть значно відрізнятись від норми, і навпаки, при нормальних біохімічних маркерах пошкодження може спостерігатися, наприклад, лейкоцитурія. Ймовірно, в таких випадках, вона має інше джерело.

Урологічні і нефрологічні захворювання, в більшості випадків, є хронічними з рецидивуючою течією, що поступово приводить до розвитку ниркової недостатності і інвалідації пацієнтів. Це пов'язано з постійною ушкоджувальною дією на функціональну тканину нирки, що зменшує її кількість і заміщає сполучною тканиною. Тому, зрештою, будь-які лікувальні заходи повинні зводитися до максимального збереження паренхіми нирки. Застосування у практичній медицині запропонованих біохімічних маркерів дозволить більшою мірою досягти цих результатів.

Спосіб здійснюють таким чином.

Отримання показників окисної модифікації і ступеня дефрагментації білка рекомендовано здійснювати на висоті дії ушкоджувальних чинників: атака гострого пієлонефриту, перша доба після травми, оперативного втручання або проведеної ДЛТ. В подальшому контроль здійснюється не рідше 1 разу на тиждень до відновлення показників. Так встановлено, що поклад від сполучення ДЛТ із запальним процесом та обструктивним синдромом відновлення показників коливається від 7 до 21 доби.

Методика визначення. Збір крові у хворих здійснюється в ранці натще. У якості антикоагулянту використовували розчин гепарину. В плазмі крові визначали ступінь окисної модифікації білків по методу В. Halliwell. Метод оцінки окисної модифікації білків заснований на реакції взаємодії окислених амінокислотних залишків з 2,4-динітрофенілгідразином (2,4-ДНФГ) з утворенням 2,4-динітрофенілгідразонів - альдегідних (АФГ) та карбоксильних (КФГ) груп, та по накопиченню продуктів дефрагментації білка.

До 0,05мл плазми, розбавленої фізіологічним розчином в співвідношенні 1:10, додають 7мл 0,5М фосфатного буфера (температура розчину 5°C) і центрифугують при 11000g 30 хвилин. До 0,1мл підготовленої проби додають 0,1мл 2,8% заліза (II) сульфату, 0,1мл 4% перекису водню і інкубують 2 години. Потім додають 1мл 25% трихлороцтової

кислоти і центрифугують 30 хвилин при 3000об/хв. До 0,5мл надосаду додають 12,0мл 0,9% натрію хлориду, спектрофотометрують при довжині хвилі 254 (КФ), 272 (СФ) і 280 (МФ) нм, розчин порівняння - 0,5М фосфатний буфер. По показнику екстинкції визначають ступінь дефрагментації белка.

До осаду, що залишився після центрифугування, додають 1мл 2,2% 2,4-динітрофенілгідразину (приготовленого на 7% розчині соляної кислоти) та інкубують 1 годину при температурі 37°C, центрифугують 10 хвилин при

3000об/хв. Осад промивають 3мл етилацетату, розчиняють у 3мл 50% розчину сечовини, додають 1 краплю 7% розчину соляної кислоти і розводять дистильованою водою в 12 разів. Підготовлений розчин спектрофотометрують при довжині хвилі 274,363нм, розчин порівняння - 0,5М фосфатний буфер. По показнику екстинкції визначають кількість альдегідних та карбоксильних груп.

Отримані показники залежно від тяжкості пошкодження відповідають наступним значенням:

	Альдегід-фенілгід-разон, УЕ	Карбоксил-фенілгід-разон, УЕ	Великі фрагменти, УЕ	Середні фрагменти, УЕ	Міlkі фрагменти, УЕ
Норма	0,070	0,070	0,063	0,063	0,060
Легкий ступінь	від 0,071 до 0,110	від 0,071 до 0,110	від 0,064 до 0,070	від 0,064 до 0,070	від 0,061 до 0,070
Середній ступінь	від 0,111 до 0,160	від 0,111 до 0,150	від 0,071 до 0,120	від 0,071 до 0,110	від 0,071 до 0,100
Тяжкий ступінь	до 0,160 та вище	до 0,150 та вище	до 0,120 та вище	до 0,110 та вище	до 0,100 та вище

Приклад. Хвора Васильєва Галина Андріївна, 1956 р.н., поступила у відділення урології Запорізької обласної клінічної лікарні 18.10.05 зі скаргами на періодичні нападоподібні болі в лівій поперековій області, підвищення температури тіла до 37,8°C ввечорами, протягом 4 діб.

При обстеженні, за даними УЗД і оглядової та внутрішньовенної урографії знайдено 2 конкременти лівої нирки, в проекції миски і пиелоуретрального сегменту. Останній викликав явища урообструкції: за даними УЗД і внутрішньовенної урографії: розширення чашок, миски і пиелоуретрального сегменту (ПУС), із зниженням функції виділення нирки - на внутрішньовенній урографії контраст з'являється на 60 хвилині. В традиційно виконуваних лабораторних дослідженнях є ознаки активації запального процесу: в загальному аналізі крові лейкоцитів -  $12,0 \times 10^9$ /л, паличкоядрових мієлоцитів -14%; ШОЕ - 22мм/г; в загальному аналізі сечі: білок - 0,165г/л; лейкоцити - на 1/2 в полі зору, еритроцити - 2-6 в полі зору. Таким чином у пацієнтки були присутні два чинники, що надають ушкоджувальну дію на паренхіму нирки - обструктивний синдром і запальний процес. Визначені в сироватці крові показники окисної модифікації і дефрагментації білка: АФГ - 0,151 У.О., КФГ - 0,119У.О., ВФ - 0,097У.О., СФ - 0,085У.О., МФ - 0,078У.О., що відповідає середньому ступеню тяжкості пошкодження паренхіми.

Хворим призначена антибактеріальна, проти-запальна терапія: цефтриаксон 1,0 2 рази на добу, диклофенак натрію 150мг 2 разу на добу. 21.10.05 проведена дистанційна літотрипсія каменя ПУС лівої нирки. Після літотрипсії відходили фрагменти. Температура нормалізувалася через 2 доби після літотрипсії. Через 7 діб після літотрипсії виконано контрольне обстеження: за даними оглядової урографії конкремент ПУС лівої нирки повністю зруйнований, осколки відійшли, залишився конкремент мисці лівої нирки. Рутинні лабораторні показники відновилися практично до нормальних значень: в загальному аналізі крові лейкоцитів -

$4,9 \times 10^9$ /л, паличкоядрових мієлоцитів -4%; ШОЕ - 9мм/г; в загальному аналізі сечі: білок - 0,099г/л; лейкоцити - 10-30 в полі зору, еритроцити - 1-4 в полі зору. А зміни маркерів пошкодження знову відповідають середній тяжкості пошкодження: АФГ - 0,133У.О., КФГ -0,117У.О., ВФ - 0.091У.О., СФ - 0,074У.О., МФ - 0,076У.О.

Таким чином ми бачимо, що не дивлячись на відновлення лабораторних показників традиційно вживаних в практичній медицині, зміни тканини нирки залишаються достатньо вираженими. Тому проведення літотрипсії з приводу каменя миски лівої нирки в ці терміни протипоказано. Хвора була виписана. Продовжувала одержувати уроантисептики, препарати, стимулюючі діурез, фітотерапевтичні засоби. 04.11.05 хвору знову госпіталізували, через 14 діб після першого сеансу літотрипсії. Був виконаний контроль показників окисної модифікації і дефрагментації білка, які відповідають нормальним значенням: АФГ - 0,72У.О., КФГ - 0,66У.О., ВФ - 0,61 У.О., СФ - 0,063У.О., МФ - 0,059У.О. 06.03.05 проведена повторна дистанційна літотрипсія. Післяопераційний період проходив без яких-небудь ускладнень. Через 7 діб на контрольній оглядовій урограмі конкремент зруйнований, осколки відійшли. Запропоновані нами маркери пошкодження і традиційно вживані лабораторні дані знаходилися в межах норми. Таким чином, запропоновані біохімічні маркери пошкодження дозволили більш точно визначити безпечні терміни проведення повторної літотрипсії, запобігши можливості потенційних ускладнень.

Даний приклад наочно відбиває зміни показників окисної модифікації і дефрагментації білка при поєднаній дії на паренхіму нирки декількох ушкоджувальних чинників: дія ударної хвилі при літотрипсії, активного запального процесу та обструктивного синдрому. Дані маркери більш точно відображають терміни реабілітації органу, порівняно з існуючими в практичній медицині.

