



УКРАЇНА

(19) UA (11) 38591 (13) A

(51) 7 G01N33/48

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ДИФЕРЕНЦІЙНОЇ ДІАГНОСТИКИ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТУ ТА ПІЄЛОНЕФРИТУ В СТАДІЇ ХРОНІЧНОЇ НИРКОВОЇ НЕДОСТАТНОСТІ IV СТУПЕНЯ

(21) 2000074557

(22) 28.07.2000

(24) 15.05.2001

(33) UA

(46) 15.05.2001, Бюл. № 4, 2001 р.

(72) Мигаль Людмила Якимівна, Нікуліна Галина Григорівна, Баран Євген Якович, Кіндій Тетяна Вікторівна, Баран Євген Євгенович

(73) Інститут урології та нефрології АМН України

(57) Спосіб диференційної діагностики гломерулонефриту та пієлонефриту в стадії хронічної ниркової недостатності IV ступеня, що включає визна-

чення в сечі активності лізосомного ферменту N-ацетил-бета-D-глюкозамінідази, який **відрізняється** тим, що додатково в сечі визначають активність лізосомного ферменту бета-галактозидази та співставляють активність N-ацетил-бета-D-глюкозамінідази до активності бета-галактозидази і при коефіцієнті співвідношення K більше 4,5, діагностують гломерулонефрит в стадії хронічної ниркової недостатності IV ступеня, а при значенні K менше 4,5 - пієлонефрит в стадії хронічної ниркової недостатності IV ступеня.

Винахід відноситься до медицини, а саме до урології та нефрології і може бути використаний для лабораторної діагностики гломерулонефриту та пієлонефриту у хворих з хронічною нирковою недостатністю IV ступеня.

Диференціація найбільш розповсюджених захворювань нирок - гломерулонефриту та пієлонефриту в стадії хронічної ниркової недостатності IV ступеня - важка навіть морфологічно. На сьогодні цілям неінвазивної диференційної діагностики цих захворювань велике значення надають визначенню змін активностей реноспецифічних ферментів, маркерів ушкодження ниркової паренхіми, в сечі. У разі діагностування ураження нирок вперше в стадії хронічної ниркової недостатності в 15% випадків встановити причину захворювання не вдається зовсім. У той же час своєчасно встановлений діагноз має велике значення для вибору правильної тактики лікування під час підготовки хворих до трансплантації нирки - єдиного дійового методу їх лікування, та в після операційному періоді.

Відомий спосіб диференційної діагностики пієлонефриту та гломерулонефриту в стадії хронічної ниркової недостатності [1], який включає визначення в крові та сечі вмісту неорганічного фосфору та креатиніну, обчислення концентраційних показників та кліренсів цих речовин і складання за допомогою ряду розрахунків математичного рівняння. Недоліками способу є неможливість диференційної діагностики цих захворювань в стадії хронічної ниркової недостатності IV ступеня, скла-

дність та трудомісткість математичних розрахунків, а також травматизація хворих забором крові.

Відомий також спосіб діагностики гломерулонефриту з хронічною нирковою недостатністю [2], взятий нами за прототип, який полягає у визначенні в сечі активності лізосомного ферменту N-ацетил-бета-D-глюкозамінідази у хворих на гломерулонефрит з хронічною нирковою недостатністю в термінальній стадії захворювання. При цьому, виявлене багаторазове підвищення сечової активності N-ацетил-бета-D-глюкозамінідази. Недоліками способу є неможливість диференційної діагностики гломерулонефриту та пієлонефриту тільки по одному показнику, а також залежність кінцевого результату від методів визначення ферментативної активності сечі та одиниць розрахунку.

В основу винаходу поставлена задача удосконалення способу диференційної діагностики гломерулонефриту та пієлонефриту в стадії хронічної ниркової недостатності IV ступеня шляхом біохімічного визначення в сечі хворих активності двох лізосомних ферментів та обчислення їх співвідношення, показник якого змінюється в залежності від основного захворювання, що забезпечить своєчасність встановлення діагнозу основного захворювання, обрання правильної тактики підготовки хворих до трансплантації нирки, адекватне лікування їх у післяопераційному періоді та покращення спеціалізованої медичної допомоги нефрологічним хворим.

Поставлена задача досягається тим, що спосіб диференційної діагностики гломерулонефриту та пієлонефриту в стадії хронічної ниркової недо-

(19) UA (11) 38591 (13) A

статності IV ступеня, який включає визначення в сечі активності лізосомного ферменту бета-галактозидази та співставлення активності N-ацетил-бета-D-глюкозамінідази до активності бета-галактозидази і при коефіцієнті співвідношення K більше 4,5 діагностують гломерулонефрит в стадії хронічної ниркової недостатності IV ступеня, а при значенні K менше 4,5 - пієлонефрит в стадії хронічної ниркової недостатності IV ступеня.

Спосіб диференційної діагностики гломерулонефриту та пієлонефриту в стадії хронічної ниркової недостатності IV ступеня виконують таким чином: при визначенні активності ферменту N-ацетил-бета-D-глюкозамінідази в пробірку беруть 0,2 мл профільтрованої сечі і додають до них 0,3 мл 0,1 М цитратного буферу рН 4,15 та 0,2 мл субстрату, який включає 10 мМ розчин 4-нітрофеніл-2-ацетамідо-2-дезоксі-бета-D-глюкопіранозиду в 0,1 М цитратному буфері рН 4,15. Проби інкубують 30 хвилин при 37°C. Потім реакцію зупиняють додаванням 0,8 мл 0,1 М розчину вуглекислого натрію. Оптичну щільність п-нітро-фенолу, що утворився, вимірюють на фотоелектроколориметрі при 400 нм порівняно з контрольною пробою, у яку розчин субстрату вносять після припинення ферментативної реакції. Ферментативну активність N-ацетил-бета-D-глюкозамінідази сечі розраховують у мкмольх п-нітрофенолу, що утворився протягом 1 години, із розрахунку на 1 ммоль креатиніну сечі, вміст якого визначають за кольоровою реакцією Яффе з пікриновою кислотою.

При визначенні активності бета-галактозидази у пробірку беруть 0,2 мл профільтрованої сечі, додають 0,3 мл 0,1 М цитратного буферу рН 4,0 та 0,2 мл субстрату, який включає 5 мМ розчин 2-нітрофеніл-бета-D-галакто-піранозиду у 0,1 М цитратному буфері рН 4,0. Проби інкубують 30 хвилин при 37°C. Реакцію зупиняють додаванням 0,8 мл 0,1 М розчину вуглекислого натрію; оптичну щільність п-нітрофенолу, що утворився, вимірюють на фотоелектроколориметрі при 400 нм проти контрольної проби, у яку розчин субстрату вносять після припинення ферментативної реакції. Ферментативну активність розраховують у мкмольх п-нітрофенолу, що утворився протягом 1 години, із розрахунку на 1 ммоль креатиніну сечі, вміст якого визначають за кольоровою реакцією Яффе з пікриновою кислотою.

Обчислюють коефіцієнт співвідношення величини активності N-ацетил-бета-D-глюкозамінідази сечі до величини активності бета-галактозидази сечі - K. Якщо K більше 4,5 - діагностують гломерулонефрит у стадії хронічної ниркової недостатності IV ступеня, якщо K нижче 4,5 - діагностують пієлонефрит у стадії хронічної ниркової недостатності IV ступеня. Коефіцієнт варіації дорівнює 3,1%.

Практичне застосування способу, наводимо на прикладах обстеження хворих, що лікувалися в інституті урології та нефрології АМН України протягом багатьох років.

Приклад 1. Х-й Л., і.х. № 1502, 33 роки, потрапив до відділення трансплантації нирки 16.04.99 р. зі скаргами на загальну слабкість, свербіння по всій поверхні тіла, безсоння, болі в м'язах гомілки, головні болі, задишку. Хворіє 12 років після перенесеного гострого гломерулонефриту, хро-

нічна ниркова недостатність спостерігається на протязі одного року. У березні 1999 р. сформована а/в фістула та розпочаті сеанси програмного гемодіалізу. При обстеженні: АД-170/100 - 130/90 мм рт. ст., ЕКГ - гіпертрофія лівого шлуночка з його переважанням, гіпертрофія лівого передсердя, значущі дистрофічні зміни міокарду, ознаки порушень коронарного кровообігу в передньо-боковій стінці лівого шлуночка. Загальний аналіз крові: Hb - 88 г/л; Ер.- $2,75 \times 10^{12}$ /л; К.п.- 0,96; Л - $9,5 \times 10^9$ /л; паличкоядерні - 2%, сегментоядерні - 56%, еозинофіли - 2%, лімфоцити - 40%, моноцити - 1%; ШОЕ - 18 мм/год. Загальний аналіз сечі: кисла, 1005, білок - 2,52%, Л - 3-4 в полі зору, Ер - 0-1 в полі зору; бактерії - мало. Засів сечі: виявлено ріст *Streptococcus faec. Anhaem.* 3×10^3 /мл. Біохімічні показники крові: вміст креатиніну - I, II - 0,905 ммоль/л; вміст сечовини - 47,9 - 32,0 ммоль/л; загальний білок - 88 г/л; А - 37,6%, Г - 62,4%, альфа₁ - 7,9%, альфа₂ - 11,9%, бета - 11,9%, гама - 30,7%, АГ - 0,6. АЛТ - 0,14 ммоль/(год.л); АСТ-0,29 ммоль/(год.л); тимолова проба - 3,5 од. Клінічний діагноз: хронічний гломерулонефрит, хронічна ниркова недостатність IV ступеня, пролонгована програмним гемодіалізом. Уремічна кардіопатія.

Застосування способу диференційної діагностики гломерулонефриту та пієлонефриту в стадії хронічної ниркової недостатності IV ступеня показало, що активність N-ацетил-бета-D-глюкозамінідази сечі - 213,52 мкмоль/год/ммоль креатиніну, активність бета-галактозидази сечі - 13,59 мкмоль/год/ммоль креатиніну. Їх коефіцієнт співвідношення K= 15,71, тобто більше 4,5, що підтверджує діагноз хронічного гломерулонефриту. 03.06.99 р. хворому була зроблена трансплантація трупної донорської нирки. Стан хворого задовільний.

Приклад 2. Хвора К., і.х. № 20, 53 роки, потрапила до відділення трансплантації нирки 04.01.99 р. зі скаргами на загальну слабкість, швидку втомлюваність, головокружіння, періодичне шкіряне свербіння, болі в області серця, головний біль. Вважає себе хворою 15 років (в анамнезі гострий пієлонефрит), погіршення стану нирок - 1 рік. 3.11.06.98 р. розпочато лікування гемодіалізом по 3 сеанси на тиждень протягом 4 годин кожний. При обстеженні: АД - 130/90 - 120/80 мм рт.ст., ЕКГ - гіпертрофія лівого шлуночка, значущі дистрофічні зміни міокарду. Загальний аналіз крові: Hb - 92 г/л; Ер. - $2,9 \times 10^{12}$ /л; К.п. - 0,95; Л - $6,3 \times 10^9$ /л; паличкоядерні - 3%, сегментоядерні - 47%, еозинофіли - 6%, лімфоцити - 43%, моноцити - 1%; ШОЕ - 42 мм/год. Загальний аналіз сечі: кисла, 1002, білок - 0,59%, Л - 3-5 в полі зору, Ер - малозмінені 2-4 в полі зору, бактерії - незначна кількість. Засів сечі: виявлено ріст *E. coli anhaem.* 3×10^4 /мл. Біохімічні показники крові: вміст креатиніну - 1,17-0,75 ммоль/л; вміст сечовини - 54,0-35,0 ммоль/л; загальний білок - 62,7 г/л, А - 38,0%, Г - 62,0%, альфа₁ - 7,1%, альфа₂ - 14,2%, бета - 22,8%, гама - 17,9%, АГ - 0,61. АЛТ - 0,50 ммоль/(год.л); АСТ - 0,36 ммоль/(год.л); тимолова проба - 2,5 од., білірубін загальний - 11,4 ммоль/л. Клінічний діагноз: хронічний пієлонефрит з розвитком зморщування нирок. Хронічна ниркова недостатність IV ступеня, пролонгована програмним гемодіалізом. Уремічні енцефало-вестибулопатія, кардіопатія.

Застосування способу диференційної діагностики гломерулонефриту та пієлонефриту в стадії хронічної ниркової недостатності IV ступеня показало, що активність N-ацетил-бета-D-глюкозамінідази сечі дорівнює 63,49 мкмоль/год/ммоль креатиніну, активність бета-галактозидази сечі - 23,48 мкмоль/год/ммоль креатиніну, коефіцієнт їх співвідношення $K=2,7$, тобто менше 4,5, що підтверджує наявність хронічного пієлонефриту у хворої з хронічною нирковою недостатністю IV ступеня. Хвора продовжує перебувати на лікуванні гемодіалізом, у подальшому можлива пересадка трупної донорської нирки.

З наведених прикладів видно, що провідними симптомами та лабораторними показниками обох хворих не є симптоми та показники основного захворювання, а є симптоми та показники наявності хронічної ниркової недостатності IV ступеня: це майже однакові скарги, величини азотемії, анемії, гіпо- та діспроїтеїнії, зміни в аналізах сечі та на електрокардіограмах.

Застосування способу диференційної діагностики гломерулонефриту та пієлонефриту в стадії хронічної ниркової недостатності IV ступеня дозволяє своєчасно діагностувати хронічний гломерулонефрит чи хронічний пієлонефрит та своєчасно проводити адекватне корегуюче лікування у до- та післятрансплантаційному періодах. Спосіб, стосується тих хворих, у яких ураження нирок вперше діагностується в стадії хронічної ниркової недостатності.

В процесі апробації даного способу, нами проведені дослідження у 25 хворих на гломерулонефрит в стадії хронічної ниркової недостатності IV ступеня (креатинін крові 0,72-1,14 ммоль/л) та у 10 хворих на пієлонефрит в стадії хронічної ниркової недостатності IV ступеня (креатинін крові 0,70-1,10 ммоль/л), також у 20 практично здорових осіб та у 70 хворих на гломерулонефрит та хронічний пієлонефрит із збереженою функцією нирки - контрольні групи (креатинін крові 0,049-0,081 ммоль/л), що перебували на лікуванні в інституті урології та нефрології АМН України, з них у 40 хворих на хро-

нічний гломерулонефрит (25 хворих з сечовим та 15 - з нефротичним синдромом) та у 30 хворих на хронічний пієлонефрит. Результати дослідження активності ферментів N-ацетил-бета-D-глюкозамінідази і бета-галактозидази сечі та коефіцієнт їх співвідношення K наведені в таблиці.

Із таблиці видно, що незважаючи на статистично вірогідну різницю поміж групами майже всіх показників, тільки крайні межі коливань чисельного показника відношення активності N-ацетил-бета-D-глюкозамінідази сечі до активності бета-галактозидази сечі у хворих на гломерулонефрит у стадії хронічної ниркової недостатності IV ступеня та пієлонефрит у стадії хронічної ниркової недостатності IV ступеня не перехрещуються. Встановлена нами точка розподілу, що дорівнює 4,5, повністю відповідає мінімуму діагностичних помилок, коли діагностична чутливість дорівнює діагностичній специфічності. Перевагою способу, є також те, що при обчисленні співвідношення активностей двох лізосомних ферментів усунуто залежність кінцевого результату від методів їх визначення, одиниць розрахунків, то що.

Таким чином, спосіб диференційної діагностики гломерулонефриту та пієлонефриту в стадії хронічної ниркової недостатності IV ступеня є точним, короткочасним (50 хв.), не трудомістким, надійним та безпечним для хворого. Діагностична ефективність способу становить 98%.

Джерела інформації.

1. Диагностическое значение определения экскреции неорганического фосфора у больных гломерулонефритом и пиелонефритом в стадии хронической почечной недостаточности / А.М. Есаян, Л.В. Могильнер, И.Г. Каюков, Ю.А. Ермаков // Нефрология. - 1997. - Том 1. - №2. - С. 53-55.

2. Диагностическое значение определения активности нейтральной α -глюкозидазы и N-ацетил- β -D-гексозаминидазы в моче при патологии почек / И.С. Лукомская, Т.П. Лавренова, Н.А. Томилина и др. // Вопр. мед. химии. - 1986. - №5. - С. 113-119.

Активність N-ацетил-бета-D-глюкозамінідази (НАГ) сечі, бета-галактозидази (бета-Гал) сечі (мкмоль/год/ммоль креатиніну) та співвідношення активності НАГ сечі до активності бета-Гал сечі (К) у хворих на хронічний гломерулонефрит (ХГН) та хронічний пієлонефрит (ХрПН) із збереженою функцією нирок (контроль) та у стадії хронічної ниркової недостатності IV ступеня (ХНН-IV)

№ за/п	Групи обстежених	Статистичний показник	Активність НАГ сечі	Активність бета-Гал сечі	Активність НАГ/Активність бета-Гал сечі (К)
1	Здорові	n	20	20	20
		M±m	11,47±1,0	10,17±1,35	1,06±0,11
		Межі коливань	7,08-21,81	3,29-18,37	0,56-1,67
2	ХГН, сечовий синдром (контроль)	n	25	25	25
		M±m	30,01±1,51	21,38±1,22	1,30±0,06
		Межі коливань	14,4-39,8	11,37-46,54	0,66-1,77
3	ХГН, нефротичний синдром (контроль)	n	15	15	15
		M±m	96,25±6,38	66,38±5,74	1,40±0,08
		Межі коливань	50,85-138,0	37,29-92,46	0,98-1,92
4	ХрПН (контроль)	n	30	30	30
		M±m	41,51±2,86	24,73±1,06	1,42±0,07
		Межі коливань	17,83-79,98	11,63-35,44	0,07-2,02
5	ХГН, ХНН-IV	n	25	25	25
		M±m	290,37±19,98	24,17±1,63	13,71±1,15
		Межі коливань	139,56-531,18	13,51-45,52	4,70-27,50
6	ХрПН, ХНН-IV	n	10	10	10
		M±m	92,83±9,80	30,47±3,70	3,16±0,20
		Межі коливань	55,13-122,23	17,75-53,39	2,29-4,28
		P ₂₋₁ <	0,001	0,001	-
		P ₃₋₁ <	0,001	0,001	0,02
		P ₃₋₂ <	0,001	0,001	-
		P ₄₋₁ <	0,001	0,001	0,01
		P ₄₋₂ <	0,001	0,05	-
		P ₄₋₃ <	0,001	0,001	-
		P ₅₋₁ <	0,001	0,001	0,001
		P ₅₋₂ <	0,001	-	0,001
		P ₅₋₃ <	0,001	0,001	0,001
		P ₅₋₄ <	0,001	-	0,001
		P ₆₋₁ <	0,001	0,001	0,001
		P ₆₋₂ <	0,001	0,02	0,001
		P ₆₋₃ <	-	0,001	0,001
		P ₆₋₄ <	0,001	-	0,001
		P ₆₋₅ <	0,001	-	0,001

ДП "Український інститут промислової власності" (Укрпатент)
Україна, 01133, Київ-133, бульв. Лесі Українки, 26
(044) 295-81-42, 295-61-97

Підписано до друку _____ 2001 р. Формат 60х84 1/8.
Обсяг _____ обл.-вид. арк. Тираж 50 прим. Зам. _____

УкрІНТЕІ, 03680, Київ-39 МСП, вул. Горького, 180.
(044) 268-25-22