

Винахід належить до медицини, точніше, до гастроентерології, і може бути використаний для діагностики інфікованості організму *Helicobacter pylori* (Hr) при запальних та ерозивно-виразкових захворюваннях гастродуоденальної зони.

Зростання числа захворювань органів травлення в останні роки робить нагальною необхідність розробки зручного неінвазивного методу діагностики цих захворювань. В Україні частота цих захворювань за останні 10 років збільшилась на 53%. В етіології гастроентерологічної патології інфекція Hr відіграє провідну роль. Інфікованість населення вже в 20-літньому віці досягає в різних країнах 30-90% (Сидоренко С.В. Діагностика и лечение инфекций, вызываемых *Helicobacter pylori*: Лекция // Антибиотики и химиотер. - 2001. - №8. - С.23-31). Hr є доведеним етіологічним фактором хронічного гастриту, пептичних виразок шлункової та дуоденальної локалізації (Домарадский И.В. Вопросы патогенности *Helicobacter pylori* // Эксперим. и клин. гастроэн-терол. - 2001. - №2. - С.45-47), а також розвитку раку шлунку (Бабак О.Я. Нужна ли антихеликобактерная терапия при хронических гастритах и пептических язвах ? // Сучасна гастроентерол. - 2001. - №3. С.3-9).

Етіологічне та патогенетичне значення Hr не обмежується захворюваннями гастродуоденальної зони. Доведено, що різноманітні токсини Hr викликають патогенетичні зміни в інших органах травлення (Губергриц Н.Б., Ост-роухова И.Н. *Helicobacter pylori* при хроническом рецидивирующем панкреатите: Патогенетические, клинические, лабораторно-инструментальные и терапевтические аспекты // Новые мед. технол. - 2001. - №1. - С.50-59), серцево-судинної системи (Рудык Ю.С., Чернышов В.А., Ченчик Т.А. Связь бактериальной и вирусной инфекции с нарушением липидного обмена у пациентов с ишемической болезнью сердца // Укр. кардиол. журн. - 2001. - №6. - С.14-17), опорно-рухового апарата (Biewer W., Stolte M. *Helicobacter pylori* colonization of the gastric mucosa in reumatic patients // Z. Gastroenterol. - 1991. - Vol.29, №11. - P.585-9), органів дихання (Caselli M., Zaffoni E., Ruina M. et al. // Scand. J. Gastroenterol. - 1999. - Vol.34, №8. - P.828-30), системи крові (Фадеев Г.Д., Рудык Ю.С. *Helicobacter pylori* и «недигестивные» заболевания: Обзор лит. и собств. исслед. // Журн. АМН України. - 2002. - Т.8, №1. - С.82-94), шкіри (Бабак О.Я. Нужна ли антихеликобактерная терапия при хронических гастритах и пептических язвах ? // Сучасна гастроентерол., гепатол. - 2001. - №3. С.3-9). Hr має значення в розвитку аутоімунних захворювань (Collin P., Karsonen A.I., Korpela M. et al. Gastritis classified in accordance with the Sydney system in patients with primary Sjogren's syndrome // Scand. J. Gastroenterol. - 1997. - Vol.32, №2. - P.108-11), анемії (Corrado G., Luzzi I., Lucarelli S. et al. Positive association between *Helicobacter pylori* infection and food allergy in children // Scand. J. Gastroenterol. - 1998. - Vol.33, №11. - P.1135-39), патології щитоподібної залози (Centanni M., Marignani M., Cargano L. et al. Atrophic body gastritis with autoimmune thyroid disease: An underdiagnosed association // Arch. Intern. Med. - 1999. - Vol.159, №9. - P.1726-30), нервової системи (Leontiadis G.I., Sharma V.K., Howden C.W. Non-gastrointestinal tract associations of *Helicobacter pylori* infection: What is the evidence? // Arch. Intern. Med. - 1999. - Vol.159, №5. - P.925-40) та ін.

Усі ці факти, а також можливість розвитку небажаних ефектів антихеликобактерної терапії, її висока вартість, особливо при наявності антибіотикорезистентних штамів, потребує розробки зручного, дешевого, неінвазивного способу діагностики інфекції Hr.

Відомий спосіб діагностики інфікованості організму Hr шляхом ендоскопічного (інвазивного) взяття біоптату гастродуоденальної слизової оболонки та його подальшого аналізування. Біоптат аналізують за уреазною, гістоморфологічною чи бактеріологічною методою (Лапина Т.Л. Основные принципы диагностики *Helicobacter pylori*: Лекція // Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. -1999. -Т.9, №2. -С.41-45).

Недоліком відомого способу діагностики є його інвазивність (зайве травмування пацієнта), недостатня точність, оскільки біоптат може бути взятий з малоінформативної зони гастродуоденальної слизової оболонки.

Відомий спосіб діагностики інфікованості організму Hr, шляхом імуноферментного дослідження проби крові пацієнта за методом ELISA (Богомаз В.М., Динник О.Б. Серологічна діагностика інфікованості *Helicobacter pylori* методом імуноферментного аналізу / Укр.мед. часопис. 2001.-№5.-С.108-10).

Відомий спосіб високовартісний, з інвазивним втручанням (для аналізування беруть кров з вени у пацієнта), непрямий, оскільки в крові визначають антитіла до Hr, які частіше за все відносяться до IgG.

Відомий, обраний за прототип, спосіб неінвазивної діагностики інфікованості організму Hr, шляхом імуноферментного дослідження проби сечі пацієнта (Yamamoto T., Tamura M., Ishii T. et al. Urinary Antibody Titers to *Helicobacter pylori* and an Impact of Clinical Characteristics / J. Clin. Gastro-entrol. - 2003. - Vol.36, №4. - P.329-31). За відомим способом діагностики у зв'язаній ферментом пробі імуносорбента на основі сечі пацієнта визначають титри антитіл до Hr. Для цього використовують комерційні аналізатори "URINELISA" (виробництва фірми Otsuka Pharmaceutical, Tokushima, Japan).

Недоліками відомого способу-прототипу є:

низька інформативність діагностики через часті випадки хибно-позитивних та хибно-негативних результатів тестування (на ранніх стадіях після зараження та після лікування;

обмеженість застосування через неможливість застосування для контролю ефективності лікування;

складність методики аналізування;

висока собівартість досліджень через необхідність придбання імуноферментних наборів, та комерційних аналізаторів "URINELISA".

Відомий спосіб діагностики призначений для використання в великих дослідницьких центрах, де окупність грошових вкладень можна компенсувати інтенсивністю досліджень.

В основу винаходу поставлено задачу в способі діагностики інфікованості організму Hr шляхом тестування проб сечі пацієнта з харчовим навантаженням розчином C¹²-сечовини методом динамічної мікфазної тензіометрії забезпечити інформативності діагнозу, можливість застосування для контролю ефективності лікування, спрощення виконання тестування та зниження його собівартості. Спосіб, що заявляється, є безпечним, дешевим, безболісним, зручним для хворого і лікаря.

Поставлена задача вирішується тим, що у заявленому способі діагностики інфікованості організму Hr шляхом дослідження проби сечі пацієнта, новим є те, що досліджують дві проби сечі пацієнта до та через 30 хвилин після харчового навантаження розчином сечовини в апельсиновому соку методом динамічної мікфазної тензіометрії,

одержані показники порівнюють шляхом підрахунку інтегрального показника поверхневого натягу (ПН) сечі $\Delta\sigma_{0-30}$ за формулою

$$\Delta\sigma_{0-30} = 1/(t_0 - t_{30}) \int_{t_{30}}^{t_0} (\sigma_0 - \sigma_{30})$$

де t_0 та t_{30} - діапазон часу життя поверхні від 0 до 30 хвилин,

σ_0 та σ_{30} - значення ПН до та після навантаження,

і, коли $\Delta\sigma_{0-30}$ приймає значення нижче 2,52 мН/м, діагностують інфікованість організму *Helicobacter pylori*.

Між сукупністю ознак винаходу і технічним результатом, якого можна досягти при його реалізації, існує причинно - наслідковий зв'язок.

Імуноферментний аналіз найбільше підходить для епідеміологічних обстежень та скринінгу. Для окремого хворого, що пред'являє гастроентерологічні скарги, імуноферментні дослідження малоінформативні. Такому хворому додатково призначають ендоскопічне обстеження, під час якого можна також взяти біоптат для уреазного, гістоморфологічного чи бактеріологічного тесту. В такому разі імуноферментний аналіз і не знадобиться.

Обмеженість застосування способу-прототипу в тому, що для контролю ефективності лікування Нр-інфекції імуноферментна діагностика не може бути застосована. Антитіла до Нр в сечі не завжди свідчать про присутність активної інфекції в слизовій оболонці шлунку. Вони можуть мати слідовий характер. Тільки в тому випадку, коли застосовано кількісну методу імуно-ферментного аналізу, і є можливість порівняти рівень антитіл після лікування з вихідним рівнем, можна зробити діагностичний висновок про інфікованість організму Нр та ефективність лікування. Для доведення успішності проведеної антигелікобактерної терапії імуноферментний аналіз сечі необхідно виконати через 6 місяців після лікування. В такому випадку титр антитіл до Нр зменшиться і при успішній терапії і при персистуванні інфекції (*Helicobacter pylori*: Basic mechanisms to clinical cure 2000 / Ed.R.H. Hunt, G.N.J. Tytgat. -Dordrecht et. al.: Kluwer Acad. Publ., 2000. - 689p.).

Діагностично інформативним вважається падіння величини титру більш, як на 50 % при аналізованні сечі, взятої і проаналізованої через 6 місяців після закінчення курсу антигелікобактерної терапії. Піврічне чекання визначення результату лікування, складність діагностики реінфекції, організації забору і зберігання проб сечі, менша доступність кількісних методів імуноферментного аналізу порівняно з якісними не дозволяють застосовувати відомий спосіб-прототип для контролю лікування інфекції Нр. До недоліків діагностики Нр за відомим способом-прототипом відносять також і хибнонегативний результат на ранніх стадіях (до 18-60 днів після зараження) - до розвитку гуморальної відповіді.

Складність методики аналізування, висока собівартість досліджень через необхідність придбання імуноферментних наборів, та комерційних аналізаторів "URINELISA" також обмежують застосування відомого способу-прототипу.

До складу біологічних рідин людини, в тому числі і сечі, багато низько-і високомолекулярні поверхнево-активні речовини або сурфактанти, котрі здатні адсорбуватись на рідких межах розділу фаз та змінювати ПН (міжфаз-ний) прискорювати чи сповільнювати процеси переносу речовини через біологічні мембрани (Динамическое поверхностное натяжение биологических жидкостей в медицине / В.Н.Казаков, О.В.Синяченко, В.Б.Файнерман, Р.Миллер. - Донецк: Изд-во мед. ун-та, 1997. - 296с.). Внаслідок виштовхування гідрофобної та притягання гідрофільної частин молекул сурфактанта утворюються поверхневі адсорбційні шари, знижується ПН біологічної рідини. Цей процес вважають одним з основних механізмів дії сурфактантів, що забезпечують життєздатність біологічних систем (Бестужева С.В. К вопросу о методических подходах в изучении сурфактантной системы легких // Клини. лаб. диагност. - 1995. - №3. - С.32-36).

Сечовина та аміак у великій кількості входять до складу сечі і впливають на ПН цієї біологічної рідини, тому інфікування організму Нр (його уреаз), ймовірно, будуть впливати на фізико-хімічний стан сечі. На цьому і ґрунтується розроблений спосіб діагностики інфікування організму Нр, що заявляється.

Спосіб, що заявляється, дозволяє одержати інтегральну інформацію про склад поверхневих шарів сечі та процеси, що відбуваються в рідкій фазі методом динамічної міжфазної тензіометрії (вимірювання змін ПН з часом). При проведенні тесту з навантаженням сечовиною та без неї при інфікованості організму Нр в сечі відбуваються зміни рівнів аміаку та сечовини, що проявляють сурфактантні властивості, а тому здатні змінювати ПН цієї біологічної рідини.

Для оцінки причин діагностичної значимості динамічної міжфазної тензіометрії спосіб випробували на 52 хворих хронічними запальними та ерозивно-виразковими захворюваннями гастродуоденальної зони, в тому числі 28 (53,8%) жінок та 24 (46,2%) чоловіків у віці від 18 до 50 років. Для порівняння обстежили також і 30 здорових: 16 (53,3%) жінок і 14 (46,2%) чоловіків у віці від 18 до 48 років. Правильність діагностики, проведеної за способом, що заявляється, було підтверджено шляхом мікроскопічного аналізування біопсійного матеріалу, взятого зі слизової оболонки гастродуоденальної зони при фіброгастроскопії (інвазивний метод) у 100% випадків. Дані дослідження наведені в таблиці.

Таблиця

Показники інтегральної різниці ПН ($\Delta\sigma_{0-30}$) сечі у обстежених хворих і здорових ($M \pm m$)

Обстежені пацієнти	число пацієнтів, чол.	$\Delta\sigma_{0-30}$ мН/м	наявність Нр (Нр+, Нр-)	
			за винаходом	мікроскопічне дослідження біоптату

Хворі	40	2,522±0,476*	Нр+	Нр+
	12	4,239±0,628	Нр-	Нр-
Здорові	17	2,085±0,324*	Нр+	Нр+
	13	5,457±0,396	Нр-	Нр-

Примітки:

* - розходження між групами здорових (Нр +, Нр -) чи між групами хворих достовірні;

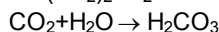
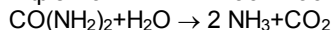
Нр+ - інфікування організму Нр виявлено;

Нр- - інфікування організму Нр не виявлено.

Методика аналізування за способом, що заявляється, проста, собівартість досліджень невисока, не потребує придбання високоякісних імуноферментних наборів, та комерційних аналізаторів. За способом, що заявляється, застосовують вітчизняний препарат – C¹²-сечовину, 1кг якої коштує 9грн. (марка "осч") (Каталог фірми "Сінбіас" (Україна), 2002/2003.- С.46).

Спосіб діагностики інфікованості організму Нр, що заявляється, здійснюють наступним чином.

Процедура збирання сечі така: зранку натщесерце пацієнт збирає першу порцію сечі. Після першого збору сечі пацієнт випиває 75мг сечовини, розчиненої в 200мл апельсинового соку (завдяки наявності аскорбінової кислоти сік гальмує евакуацію субстрату зі шлунку, а сечовина, в свою чергу, не змінює органолептичні якості соку і не піддається хімічним перетворенням у суміші з ним). Через 30 хвилин після навантаження сечовиною [CO(NH₂)₂] у хворого знову збирають порцію сечі. При наявності Нр збільшується виділення аміаку (NH₃) та вуглекислого газу (CO₂) (в сечі вуглекислий газ перетворюється у вугільну кислоту (H₂CO₃), що і призводить до зміни фізико-хімічних властивостей сечі після навантаження:



Проби сечі (до та після навантаження) досліджують методом динамічної міжфазної тензіометрії. Одержані показники порівнюють шляхом підрахунку

інтегрального показника ПН $\Delta\sigma_{0-30}$ за формулою

$$\Delta\sigma_{0-30} = 1/(t_0 - t_{30}) \int_{t_{30}}^{t_0} (\sigma_0 - \sigma_{30}),$$

де t_0 та t_{30} - діапазон часу життя поверхні від 0 до 30 хвилин,

σ_0 та σ_{30} - значення ПН до та після навантаження.

В разі, коли $\Delta\sigma_{0-30}$ приймає значення нижче 2,52мН/м, діагностують інфікованість організму Нр. Як показали дослідження, значення $\Delta\sigma_{0-30}$ вище 2,52мН/м свідчать про відсутність інфікованості організму Нр.

Для досліджень ПН сечі методом динамічної міжфазної тензіометрії використовують тензіометр МРТ-2 (LAUDA, ФРН), робота якого ґрунтується на методі максимального тиску в бульбашці. Для досліджень сечі застосовують комп'ютерну програму для управління тензіометром та обробки результатів, розроблену та адаптовану авторами винаходу до вивчення біологічних рідин (Динамическое поверхностное натяжение биологических жидкостей в медицине / В.Н.Казаков, О.В.Синяченко, В.Б.Файнерман, Р.Миллер. - Донецк: Изд-во мед. ун-та, 1997. - 296с.). Абсолютна похибка вимірювань не перевищувала 0,1мН/м.

Приклади реалізації способу, що заявляється.

Приклад 1. Хворий К., 45 років, слюсар, поступив до гастроентерологічної клініки зі скаргами на біль в епігастрію натщесерце або через 1,5-2 години після прийому їжі, печію, блювання, що приносить полегшення. Протягом останніх 5 років лікувався традиційно з приводу виразкової хвороби дванадцятипалої кишки - приймав антисекреторні, спазмолітичні препарати і т. ін.

Стан хворого К. після лікування покращувався. Але рецидиви хвороби були досить частими.

В клініці хворому К. провели діагностування на наявність інфікованості організму Нр за способом, що заявляється.

Зранку натщесерце пацієнт збирав першу порцію сечі. Фізико-хімічні показники сечі вивчали двічі - до навантаження сечовиною та через 30 хвилин після нього. Після першого збору сечі хворий К. випив 75мг сечовини, розчиненої в 200мл апельсинового соку. Через 30 хвилин після навантаження сечовиною у хворого знову збирав порцію сечі. Обидві проби сечі (до та після навантаження) досліджували за методом динамічної міжфазної тензіометрії для визначення ПН (метод максимального тиску в бульбашці) з використанням тензіометра МРТ-2 (LAUDA, ФРН), оснащеного комп'ютерною програмою для управління тензіометром та обробки результатів. Одержані показники порівнювали шляхом підрахунку інтегрального показника ПН $\Delta\sigma_{0-30}$ за формулою

$$\Delta\sigma_{0-30} = 1/(t_0 - t_{30}) \int_{t_{30}}^{t_0} (\sigma_0 - \sigma_{30}),$$

де t_0 та t_{30} - діапазон часу життя поверхні від 0 до 30 хвилин,

σ_0 та σ_{30} - значення ПН до та після навантаження.

Після підрахунків одержали, що $\Delta\sigma_{0-30}$ має значення 2,50мН/м. Згідно з винаходом у хворого К. діагностували інфікованість організму Нр. Правильність діагностики, проведеної за способом, що заявляється, було підтверджено шляхом мікроскопічного аналізування біопсійного матеріалу, взятого зі слизової оболонки

дванадцятипалої кишки в зоні виразки при фіброгастро-дуоденоскопії. Хворому К. провели антигелікобактерне лікування амоксициліном, кларитроміцином, омепразолом за загальноприйнятими методиками протягом 7 днів. Покращання стану хворий відзначав уже в перші дні терапії. На 10-й день перебування в гастроентерологічній клініці хворого К. виписали додому. Через 4 тижні після виписки хворий К. прийшов до клініки для контрольного дослідження. Фіброгастродуоденоскопія виразкового ураження слизової оболонки дванадцятипалої кишки не виявила. Мікроскопічний аналіз біопсійного матеріалу, взятого зі слизової оболонки дванадцятипалої кишки, Нр не виявив. Протягом наступних 2-х років рецидивів загострення виразкової хвороби у пацієнта К. не було.

Приклад 2. Пацієнтка Л., 35 років, здорова, скарг не пред'являла. Звернулась до гастроентерологічної клініки з проханням провести діагностування щодо інфікованості її організму Нр, оскільки у її чоловіка, що страждає на виразкову хворобу шлунку, виявлено Нр. Процедуру діагностики проведено за прикладом 1. Після підрахунків одержали, що $\Delta\sigma_{0-30}$ має значення 2,49мН/м. Згідно з винаходом у пацієнтки Л. діагностували інфікованість організму Нр. Правильність діагностики, проведеної за способом, що заявляється, було підтверджено шляхом мікроскопічного аналізування біопсійного матеріалу, взятого зі слизової оболонки гастродуоденальної зони при фіброгастр-родуоденоскопії. Пацієнтці Л. пояснили, що вона є носієм Нр і існує небезпека розвитку запального чи виразкового процесу гастродуоденальної зони. Пацієнтка Л. забажала пройти профілактичне антигелікобактерне лікування. Їй провели антигелікобактерне лікування амоксициліном, кларитроміцином, омепразолом протягом 7 днів. Через 4 тижні здійснили контрольне дослідження за способом, що заявляється. Процедуру діагностики проведено за прикладом 1. Після підрахунків одержали, що $\Delta\sigma_{0-30}$ має значення 2,54мН/м.

Згідно з винаходом діагностували відсутність інфікованості організму Нр у пацієнтки Л. В подальшому пацієнтка в гастроентерологічну клініку не зверталась.

Приклад 3. Доброволець І., 22 років, здоровий, скарг не пред'являв, прийняв участь у науковому дослідженні щодо ефективності способу діагностики інфікованості організму Нр, який заявляється. Процедуру діагностики проведено за прикладом 1. Після підрахунків одержали, що $\Delta\sigma_{0-30}$ має значення 2,55мН/м. Згідно з винаходом у добровольця І. діагностували відсутність інфікованості організму Нр. Правильність діагностики, проведеної за способом, що заявляється, було підтверджено шляхом мікроскопічного аналізування біопсійного матеріалу, взятого зі слизової оболонки гастродуоденальної зони при фіброгастродуоденоскопії.