



УКРАЇНА

(19) UA (11) 54150 (13) U
(51) МПК (2009)
G01N 33/48

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ ЗАПАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНУ ХВОРОБУ НИРОК З АРТЕРІАЛЬНОЮ ГІПЕРТЕНЗІЄЮ

1

2

(21) u201005623

(22) 11.05.2010

(24) 25.10.2010

(46) 25.10.2010, Бюл.№ 20, 2010 р.

(72) ВЛАСЕНКО МИХАЙЛО АНТОНОВИЧ, ШЕ-
ЛЕСТ БОРИС ОЛЕКСІЙОВИЧ

(73) ХАРКІВСЬКА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ ПІСЛЯ-
ДИПЛОМНОЇ ОСВІТИ

(57) Спосіб діагностики запальних процесів у хворих на хронічну хворобу нирок з артеріальною гіпертензією, що включає дослідження плазми крові та визначення рівня прозапального цитокіну ІЛ-1 β , який **відрізняється** тим, що додатково в пробі плазми крові досліджують вміст протизапального цитокіну ІЛ-4, і при вмісті прозапального цитокіну ІЛ-1 β вище 50,5 пг/мл, а інтерлейкіну-4 - нижче 10,4 пг/мл - діагностують запальні зміни.

Корисна модель відноситься до медицини, а саме до нефрології, і може бути використана для діагностики запальних процесів у хворих на хронічну хворобу нирок (ХХН), при первинних хронічних гломерулярних ураженнях ПХГУ) з артеріальною гіпертензією.

Дифузним захворюванням нирок властиві запальні процеси з поступовою заміною функціонуючих нефронів склеротичною тканиною та розвитком хронічної ниркової недостатності (ХНН). Найчастішими причинами ХНН залишаються первинні хронічні гломерулярні ураження різної етіології.

Методи дослідження нирок включають засоби оцінки їхньої структурної цілісності (аналіз сечі та мікроскопія її осадку, радіонуклідні методи та біопсія нирки), функціонального стану (характеризують екскреторну функцію), а також імунологічні та мікробіологічні дослідження.

В поточний час, при визначенні запальних процесів у хворих на ХХН з артеріальною гіпертензією багато уваги приділяють біохімічним та імуноферментним методам діагностики, серед яких ступінь клубочкового ураження та поширення ренального фіброзу опосередковано визначається шляхом визначення прозапальних (інтерлейкіну-1 β) і протизапальних (інтерлейкіна 4 (ІЛ 4) цитокінів у плазмі крові.

Дані про існування маркерів активації клітин запалення, зокрема ІЛ-1 β і ІЛ-4, спрямували дослідників на використання їх наявності (в залежності від рівня їх концентрації) як більш чутливих показників активності запалення при ХХН з артеріальною гіпертензією.

За даними літератури відомо, що на ранніх стадіях захворювання в процесах запалення при первинних хронічних гломерулярних ураженнях багато залежить від активності ренального запального процесу та дії медіаторів ушкодження. До найбільш значущих гуморальних медіаторів імунно-запального процесу в нирці сучасні дослідники відносять групу прозапальних цитокінів [Дріянська В.Є., Драннік Г.М., Калініна НА. і др. Продукція ІЛ-1 β та ІЛ-6 імунокомпетентними клітинами, активність цих цитокінів в сечі у хворих на хронічні інфекції сечової системи. //Укр. журн. нефрології та діалізу. - 2005. - №1. - С.11-13]. Їх рівень в периферичній крові пацієнтів з нирковою патологією почали активно досліджувати лише останнім часом. Хоча відомо, що ураження ниркової тканини, спричинене медіаторами запалення, може провокувати модифікацію антигенів нирки та сприяти виникненню повторної хвилі гуморальної або клітинної відповіді, що сприяє прогресуванню процесу. Тому так важливо досліджувати продукцію таких цитокінів з метою прогнозування перебігу захворювання. Ключовим цитокіном, що виявляється вже на ранніх стадіях гломерулярного пошкодження і якому належить вирішальна роль в індукції дії "каскаду" інших прозапальних агентів є інтерлейкін - 1Я. Цей монокін уявляється активним учасником прогресування гломерулярного запалення, розвитку тубулоінтерстиційних ушкоджень та процесів фіброгенезу в ниркових структурах.

Спосіб має такі недоліки:

Результати, що отримують за методикою визначення чинників запалення прозапальних інтерлейкінів - інтерлейкіна 1 β у поєднанні з визначен-

(19) UA (11) 54150 (13) U

ням другого прозапального цитокіну - інтерлейкіну 6 не дають можливості дати повну оцінку запальної реакції, так як вони визначають подібні гуморальні фактори;

Визначення протизапальних факторів не враховується, що є далеко не повним в визначенні запального процесу в цілому;

Аналог передбачає визначення також інтерлейкіну-6. І хоча він синтезується і остеобластами, кератиноцитами, синовіальними клітинами і названі клітини не мають прямого відношення до імунної системи, проте він в недостатній мірі дає можливість оцінити стан запального процесу.

Найбільш близьким за технічною сутністю та результатом, що досягається, є спосіб виявлення прогресування гломерулонефриту за допомогою визначення прозапальних цитокінів в плазмі крові [Топчій І.І., Гальчинська В.Ю., Семенових П.С. Порушення секреції прозапальних цитокінів у хворих на хронічний гломерулонефрит та хронічний пієлонефрит. // Укр.журнал нефрології та діалізу - 2009. - №3. - С.3-5), який обраний за прототип.

Клінічні дослідження прозапальних цитокінів при різних патологічних станах свідчить, що зміни їх рівня в плазмі крові відмічаються як в бік підвищення. Відомо, що при гломерулонефриті цей показник значно підвищується у хворих з нефротичним синдромом. При цьому концентрація ІЛ-1 β позитивно корелює з інтерлейкіном-6, ступенем протеїнурії.

Але вищеназваний спосіб не дозволяє визначати запальний процес, тому що передбачає визначення тільки двох показників запалення (прозапальних цитокінів 1 β і ІЛ-6) і не передбачає визначення та врахування інших важливих показників запалення, зокрема кількісну характеристику вмісту протизапальних цитокінів (інтерлейкіну-4).

Основним недоліком прототипу і відомих аналогів є їх недостатня точність, за рахунок того, що кожний з них дає змогу оцінювати тільки окремі прозапальні фактори, які викликають прогресування гломерулярних ушкоджень, що недостатньо для оцінки функціонального стану нирок.

Незважаючи на експериментальне обґрунтування участі названих медіаторів-цитокінів в патогенезі первинних гломерулярних ушкодженнях, клінічні дослідження щодо аспектів їх значення у процесі прогресування даного захворювання малочислені та суперечливі. Зокрема не висвітлюється їх взаємовплив та взаємозв'язок з іншими факторами ниркового ушкодження.

В основу корисної моделі покладено задачу удосконалення способу діагностики запальних процесів у хворих на хронічну хворобу нирок з артеріальною гіпертензією, в якому за рахунок визначення додаткового показника, досягається визначенням ступеню активності запального процесу та ступеню процесу склерозування нирок.

Поставлена задача вирішується у способі діагностики запальних процесів у хворих на хронічну хворобу нирок з артеріальною гіпертензією, який включає дослідження плазми крові та визначення рівня прозапального цитокіну ІЛ-1 β , згідно з корисною моделлю, додатково в пробі плазми крові досліджують вміст протизапального цитокіну ІЛ-4, і

при вмісті прозапального цитокіну ІЛ-1 β вище 50,5 пг/мл, а інтерлейкіну 4 - нижче 10,4 пг/мл - діагностують запальні зміни.

Отже, визначення плазмових концентрацій названих медіаторів-цитокінів як окремо, так і з позиції взаємного впливу, може мати суттєве наукове, клінічне та діагностичне значення, відкриваючи великі можливості для діагностики, попередження, прогнозування перебігу, ісходу та вибору патогенетичне обґрунтованого лікування хронічних захворювань нирок.

Обидва цитокіни мають вагомий системний вплив, визначаючи перебіг запалення при цій хворобі та її прогноз, зокрема розвиток ускладнень уремії.

Підвищення точності визначення перебігу запальних процесів при первинних хронічних гломерулярних ушкодженнях досягається за рахунок того, що при визначенні рівня інтерлейкіну 1 β оцінюють ступінь активності запального процесу нирок, а за величиною ІЛ-4, оцінюють активність протизапального процесу, які є достатньо об'єктивними показниками. Окрім цього, значення зростання показників ІЛ-1 β та зниження ІЛ-4 є маркерами погіршення стану хворих, в той час як інші показники не виходять за межі даної форми або ступеня.

Літературні дані свідчать про те, що інтерлейкіни здатні стимулювати фіброгенез ниркової тканини за допомогою підвищення продукції активації макрофагів, цитокінів та факторів росту.

Спосіб, що заявляється, здійснюють наступним чином. Визначають рівень інтерлейкіну-4 та інтерлейкіну -1 β згідно «Інструкції для користувача тест-системою ІФА для кількісного визначення інтерлейкіну-4»(Донецьк, ТОВ «Укрмедсервіс».- 2005.-7с.) та Інструкції для користувача тест-системою ІФА для кількісного визначення інтерлейкіну-1 β (Донецьк, ТОВ «Укрмедсервіс». 2007.-7с.).

Після визначення наявності запального процесу проводять інтеграцію отриманих показників за даними кількісного визначення прозапального (інтерлейкіну 1 β) і протизапального (інтерлейкіну-4).

Для визначення показника норми, нами було обстежено 21 практично здорову особу, серед обстежених здорових осіб були представлені різні вікові групи (згідно рекомендацій ВОЗ), середній вік складав 38,7 \pm 12,3 роки, - жінок було 54%, чоловіків - 46% і де рівень інтерлейкіну-4 становив 15,2 \pm 4,8 пг/мл, а інтерлейкіну 1 β - 62,95 \pm 12,45 пг/мл. Після обчислення результатів обстеження групи здорових осіб рівень інтерлейкіну-4 у хворих на ХХН з первинними гломерулярними ураженнями з артеріальною гіпертензією складав від 10,4 до 20,0 пг/л; при цьому нижня межа виявлення їх становила - 10,4 пг/л, а інтерлейкіну-1(3 в діапазоні від 50,5 до 75,4 пг/мл (62,95 \pm 12,45 пг/мл), при цьому нижня межа їх виявлення становила - 50,5 пг/мл. При рівні інтерлейкіну-4 нижчому від 10,4 пг/мл в поєднанні з визначенням прозапального цитокіну - інтерлейкіну-1 β вище від 50,5 пг/мл встановлюють запальну реакцію у хворих на ХХН

з первинними гломерулярними ураженнями з артеріальною гіпертензією.

Аналіз отриманих нами результатів дослідження свідчить про те, що підвищення рівня інтерлейкіну - 1 β відбувається вже на ранніх стадіях захворювання, коли ще функція нирок є достатньою, причому цей рівень тим вищий, чим менше часу пройшло від початку захворювання. Можливо, рівень ІЛ-1 β відображає активність ренального запалення та швидкість прогресування первинних хронічних гломерулярних ушкоджень. Між рівнем інтерлейкіну-1 β і інтерлейкіну-4 плазми крові виявлено зворотну залежність: при прогресуванні первинних хронічних гломерулярних ушкоджень відмічено динамічне зниження вмісту інтерлейкіну-1 β в плазмі крові. На концентрацію інтерлейкіну - 1 β і інтерлейкіну-4 в плазмі крові мали вплив ступінь артеріальної гіпертензії та протеїнурії, а також вік пацієнтів.

Спосіб ілюструють наступні приклади його клінічного використання.

Приклад 1. Обстежуваний М., 42 роки. Діагноз. Практично здоровий. При проведенні проби з визначенням інтерлейкінів не виявлено запальних процесів (значення показників інтерлейкіну - 1 β становить 47,8 пг/л). При кількісному дослідженні вмісту інтерлейкіну - 4 в сироватці крові встановлено нормальні їх значення (16,7 пг/л). Висновок. Відсутність запальних процесів.

Приклад 2. Обстежена М., 44 років. Діагноз: ХХН П ступеню. Хронічний гломерулонефрит, загострення. Нефротичний синдром, безперервно рецидивуючий. Симптоматична артеріальна гіпертензія. ХНН І ступеню. При проведенні проби з визначенням запального процесу виявлено підвищення показників прозапального інтерлейкіну 1 β до 78,6 пг/л. При кількісному визначенні вмісту інтерлейкіну - 4 в сироватці крові встановлено зниження його до 7,6 пг/л.

Висновок. Діагностовано запальну реакцію у хворих з первинними гломерулярними ураженнями з артеріальною гіпертензією.

Приклад 3. Хвора Л., 43 років (№ історії хвороби 5881, порядковий номер у дослідженні 49), поступила до нефрологічного відділення ХМКЛШНД №4 ім.проф.М.О.Мещанінова зі скаргами на набряки, задишку при фізичному навантаженні, біль в попереку, загальну слабкість.

Анамнез хвороби. Вважає себе хворою з 2003 року, коли вперше помітила набряки обличчя, виражену слабкість. При обстеженні виявлено зміни в аналізі сечі, за місцем проживання діагностовано хронічний гломерулонефрит, нефротичний синдром. Дебюту хвороби передувала ангіна з інтоксикаційним синдромом. З 2006 року - артеріальна гіпертензія, з 2008 - ХНН І ступеню. Регулярно отримує курси стаціонарного лікування, постійна підтримуюча доза кортикостероїдів - 20мг преднізолону на добу. За даними анамнезу життя - часті ангіни.

Дані об'єктивного статусу: загальний стан середнього ступеню важкості, шкіряні покрови тілесного кольору. Незначні набряки обличчя, нижні кінцівки. Над грудною клітиною дихання везикулярне, частота - 18 за хвилину. Межі відносної тупос-

ті серця розширені ліворуч (0,5см зовні від І.medioclavicularis sinistra). При аускультатії серця - діяльність ритмічна, І тон на верхівці послаблений, акцент ІІ тону над аортою. АТ 145/95мм.рт.ст., пульс 82 за хвилину. Симптом Пастернацького негативний з обох боків.

Дослідження крові. Клінічний аналіз крові: еритроцити 4,3 $\cdot 10^{12}$ /л, Нв 122г/л, ЦП 0,82, лейкоцити 4,2 $\cdot 10^9$ /л, паличкоядерні 4%, сегментоядерні 58%, еозинофіли 2%, моноцити 4%, лімфоцити 32%, ШОЕ 46мм/год.

Біохімічний аналіз крові: загальний білок 48,4г/л, креатинин крові 134,6мкмоль/л, сечовина крові 10,2ммоль/л, ШКФ (методом Cockcroft - Yault) - 68,2мл за хв.

Вміст електролітів: Na⁺ -132,ОмМоль/л, K⁺ - 4,1 мМоль/л, Ca⁺ -2,18ммоль/л.

Печінкові проби: АЛТ 0,49мМоль/л, АСТ 0,46мМоль/л, тимолова проба 1,8од., загальний/прямий білірубін 18,4/5,2мкМоль/л.

Дослідження сечі. Клінічний аналіз сечі: питома вага 1012, рН 6,2, білок 2,8г/л, лейкоцити 7-12 екз. в полі зору, еритроцити 8-11 екз. в полі зору, циліндри - гіалінові та зернисті 4-5. Добова протеїнурія 10,2г/добу.

Аналіз сечі за Нечипоренком: лейкоцити 0,844⁶/л, еритроцити 1,3 $\cdot 10^6$.

Аналіз сечі за Зимницьким: добовий діурез 1050,0мл, співвідношення денного до нічного діурезу 0,7/0,6, питома вага 1003-1010.

ІФА від 22.04.09: Інтерлейкін - 1 β 108 пг/мл, інтерлейкін - 4 4,7 пг/мл.

ЕКГ - ритм синусовий, ЧСС 82 за хв. Ознаки гіпертрофії міокарда лівого шлуночка.

УЗД - ознаки дифузної патології нирок.

Діагноз. ХХН П ступеню. Хронічний гломерулонефрит, загострення. Нефротичний синдром, безперервно рецидивуючий. Симптоматична артеріальна гіпертензія. ХНН І ступеню.

Аналіз даних, що отримані при обстеженні даної пацієнтки, звертає на себе увагу висока плазмова концентрація фібрoneктину, що перевищує нормальні показники у три рази. Вірогідно, це підвищення є компенсаторною реакцією організму на великі втрати білку з сечею (зокрема, гіперсинтезом гепатоцитами плазмової фракції фібрoneктину) при нефротичному синдромі. Окрім того, з урахуванням фіброгенного ефекту даного медіатора, максимальна величина його плазмової фракції визначається на початкових етапах розвитку нефросклеротичного процесу. Відносно низький вміст інтерлейкіну - 1Я з одного боку, можливо, обумовлений зниженням активності запального процесу на початку розвитку фіброзу реальних структур, з іншої - терапевтичним ефектом кортикостероїдних гормонів.

Приклад №4. Хвора К., 42 років (№ історії хвороби 5394, порядковий номер у дослідженні 72, оступила до нефрологічного відділення ХМКЛШНД М.Харкова ім. проф.О.В.Мещанінова 12.05.09 зі скаргами на задишку при мінімальному фізичному навантаженні, відсутність апетиту, нудоти, різку загальну слабкість.

Анамнез хвороби. Вважає себе хворою з 1992 року, коли під час першої вагітності помітила на-

бряки обличчя, виражену слабкість. При обстеженні виявлено протеїнурію, зміни сечового осаду, діагностовано нефропатію вагітних. З 1999 року - артеріальна гіпертензія, з 2002 року - ХНН І ступеню. Регулярно отримує курси стаціонарного лікування.

За даними анамнезу життя - часті ангіни.

Дані об'єктивного статусу. Загальний стан тяжкий. Шкіряні покрови бліді. Кахексія. Набряки обличчя, нижніх кінцівок. Над грудною клітиною дихання везикулярне, частота - 18 за хвилину. Межі відносної тупості серця розширені ліворуч (1,5 см зовні від I. medioclavicularis sinistra). При аускультатії серця - діяльність ритмічна, І тон на верхівці послаблений, акцент ІІ тону над аортою, систолічний шум у всіх точках аускультатії. АТ 165/105 мм.рт.ст., пульс 92 за хв. Печінка виступає за межі реберного краю на 4 см, край її м'який, щільний. Симптом Пастернацького негативний з обох боків.

Дослідження крові. Клінічний аналіз крові: еритроцити $3,1 \cdot 10^{12}/л$, Нв 81 г/л, ЦП 0,78, лейкоцити $4,3 \cdot 10^9/л$: паличкоядерні 4%, сегментоядерні 57%, еозинофіли 3%, моноцити 2%, лімфоцити 34%, ШОЕ 38 мм/год.

Біохімічний аналіз крові: загальний білок 63,0 г/л, креатинін крові 484,0 мкмоль/л, сечовина крові 15,4 ммоль/л, ШКФ (методом Cockcroft - Yault) - 15,0 мл за хв.

Вміст електролітів: Na⁺ - 130,0 мМоль/л, K⁺ - 7,0 мМоль/л, Ca²⁺ - 1,6 ммоль/л.

Печінкові проби: АЛТ 0,46 мМоль/л, АСТ 0,52 мМоль/л, тимолова проба 6,0 од., загальний/прямий білірубін 15,6/4,3 мкмоль/л.

Добовий діурез: 850,0 мл.

Аналіз сечі клінічний: питома вага 1006, рН 6,2, білок 3,4 г/л, еритроцити 9-11 екз. в полі зору, лейкоцити 7-12 в полі зору, циліндри гіалінові та зернисті 6-8, епітеліальні 2-3 в полі зору. Добова протеїнурія 2,9 г/добу.

Аналіз сечі за Нечипоренком: лейкоцити 0,7-10%, еритроцити 1,2-10%.

Аналіз сечі за Зимницьким: добовий діурез 750,0 мл, питома вага 1003-1010 кг/л.

ЕКГ - ритм синусовий, ЧСС 94 за хв. Ознаки гіпертрофії та дифузні зміни міокарда лівого шлуночка.

УЗД нирок - ознаки дифузної патології та вторинного зморщування паренхіми нирок.

ФГДС: ознаки атрофічного гастриту.

Консультація офтальмолога: ангіопатія судин сітківки за гіпертрофічним типом.

ІФА: Інтерлейкін - 1β 116,4 пг/мл, інтерлейкін 4 - 4,2 пг/мл.

Діагноз: ХНН III ст. Хронічний гломерулонефрит, загострення. ХПН ПІ ступеня. Симптоматична артеріальна гіпертензія. Анемія. Атрофічний гастрит. При повторному надходженні в стаціонар. З даних об'єктивного обстеження: загальний стан важкий. Шкірні покриви бліді. Анасарка. Над грудною кліткою дихання ослаблене, поодинокі вологі хрипи. Частота дихання - 26 за 1 хвилину. Ліва межа відносної серцевої тупості зміщена вліво - на 2 см назовні від I. medioclavicularis sinistra. Аритмія, частота серцевих скорочень - 110 за 1 хвилину. 1-

й тон на верхівці ослаблений, акцент 2-го тону над аортою. Систолічний шум у всіх точках аускультатії. Пульс аритмічний, 106 ударів за хвилину. АТ 175/105 мм.рт.ст. Симптом Пастернацького негативний з обох боків.

Аналіз крові клінічний: еритроцити $2,7 \cdot 10^{12}/л$, Нв 61 г/л, ЦП 0,78, ШОЕ 28 мм/год, лейкоцити $3,2 \cdot 10^9/л$, лейкоцитарна формула не змінена.

Аналіз сечі клінічний: відносна щільність сечі 1007, білок 2,6 г/л, еритроцити 12-15 екз. у полі зору.

Біохімічний аналіз крові: загальний білок крові - 54 г/л, креатинін крові - 867,0 мкмоль/л, сечовини - 24,6 ммоль/л.

Швидкість клубочкової фільтрації - 9,8 мл/хв..

Добовий діурез 650,0 мл за добу.

Білірубін загальний/прямий 14,8/3,4 мкмоль/л.

Калій 5,7 ммоль/л. Натрій 129,0 ммоль/л Кальцій 1,7 ммоль/л.

ЕКГ: миготлива аритмія, ЧСС 118 за хвилину, електрична вісь серця відхилена вліво, дифузійні зміни міокарда лівого шлуночка.

УЗД нирок: ознаки дифузійної патології і вторинного зморщування паренхіми нирок.

ФГДС: ознаки атрофічного гастриту.

Консультація офтальмолога: ангіопатія судин сітківки по гіпертонічному типу.

ІФА: Інтерлейкін - 1β 115 пг/мл, інтерлейкін - 4 2,4 пг/л.

Діагноз: Хронічний гломерулонефрит. ХНН IV ступеня. Симптоматична артеріальна гіпертензія. Анемія. Уремічна кардіоміопатія. СН П Б стадії. Атрофічний гастрит.

Аналізуючи отримані дані, ми бачимо, що в міру прогресування хвороби, наростання ниркової недостатності, формування поліорганної недостатності відбувається убування плазмової концентрації інтерлейкіну-4 з рівнобіжним збільшенням показника інтерлейкіну-1β.

Таким чином, досліджувані цитокіни представляються активними учасниками запалення у хворих на ХНН при первинних хронічних гломерулярних ураженнях. Визначення їх плазмових концентрацій може бути рекомендоване для впровадження в практику в якості діагностичних і прогностичних критеріїв даного захворювання, а динамічне спостереження за їх показниками може відбивати ефективність проведеної терапії.

Спосіб не потребує спеціальної підготовки лікаря, передбачає лише незначні економічні витрати на придбання реактивів та приладів для визначення інтерлейкінів (інтерлейкіну 1β та інтерлейкіну-4) типового тонометру та реактивів і приладів для визначення функціонального стану нирки.

Використання способу, що пропонується, дозволило вчасно за комплексною оцінкою результатів визначення прозапального ІЛ-1β та протизапального ІЛ-4 з урахуванням функціонального стану нирки діагностувати запальні процеси у хворих на ХНН з первинними хронічними гломерулярними ушкодженнями з артеріальною гіпертензією, що в підсумку приводило до оптимізування лікування і призначення адекватної патогенетичної терапії і давало можливість відвернути появу ускладнень.

