



УКРАЇНА

(19) UA (11) 55271 (13) U
(51) МПК (2009)
A61B 10/00
G01N 33/48
G01N 33/49

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ ОСОБЛИВОСТЕЙ ПОШКОДЖЕННЯ ЕНДОТЕЛІЮ ТА ПРОЯВІВ ПАТОЛОГІЧНИХ ЗМІН У СУДИНАХ ПРИ ХРОНІЧНІЙ ХВОРОБІ НИРОК

1

(21) u201006531

(22) 28.05.2010

(24) 10.12.2010

(46) 10.12.2010, Бюл.№ 23, 2010 р.

(72) ТОПЧІЙ ІВАН ІВАНОВИЧ, КІРІЄНКО ОЛЕКСАНДР МИКОЛАЙОВИЧ, ЄФІМОВА НАТАЛІЯ ВОЛОДИМИРІВНА, ЩЕНЯВСЬКА ОЛЕНА МИКОЛАЇВНА, ЛІСОВА ГАННА ВОЛОДИМИРІВНА

(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ТЕРАПІЇ ІМ. Л.Т.МАЛОЇ АМН УКРАЇНИ"

(57) Спосіб оцінки особливостей пошкодження ендотелію та проявів патологічних змін у судинах при хронічній хворобі нирок, який включає проведення загальноприйнятих досліджень крові та сечі з визначенням у сечі наявності або відсутності білка, який **відрізняється** тим, що додатково як прямі маркери структурного пошкодження судин-

2

ного ендотелію визначають кількість циркулюючих злуцених ендотеліальних клітин у збагаченій тромбоцитами плазмі та концентрацію розчиненого кадгерину судинного ендотелію (VE-кадгерину) у сироватці крові, здійснюють сумісну оцінку прямих маркерів, і якщо, у порівнянні з встановленою нормою, кількість циркулюючих злуцених ендотеліальних клітин у 10 мкл збагаченої тромбоцитами плазмі та концентрація VE-кадгерину у сироватці крові підвищені не менше ніж у 2 рази, роблять висновок про пошкодження цілісності ендотелію та наявність патологічних змін у судинах, які виражаються у порушенні міжклітинної адгезії судинного ендотелію, що є взаємопов'язаними та підсилюючими факторами ризику розвитку серцево-судинних ускладнень при хронічній хворобі нирок.

Корисна модель відноситься до галузі медицини, а саме до кардіології, нефрології і може бути використана для оцінки структурної цілісності ендотеліального шару судинної стінки та проявів патологічних змін у судинах при хронічній хворобі нирок (ХХН).

Ендотелій судин є єдиним органом, який регулює гемодинаміку та перфузію відповідно до потреб кожного органу або тканини. Порушення цих регуляторних впливів призводить до змін в органах та системах, які слугують патогенетичною основою для багатьох патологічних процесів, зокрема при хронічних захворюваннях нирок. Зменшення пошкодження, корекція та підтримка адекватного функціонування ендотелію є одним з найбільш актуальним завданням сучасної терапії судинної патології. (Ю.И. Головченко, М.А. Трещинская. Обзор современных представлений об эндотелальной дисфункции.// Consilium Medicum. - 2008 / Том 2 / № 11.- стор. 38-40). На даний час кількісних методів визначення уражень судин у пацієнтів на хронічну хворобу нирок на ранніх етапах захворювання вкрай недостатньо. Тому

необхідним є: пошук нових прямих маркерів ендотеліального пошкодження, кількісна оцінка яких дозволить визначати ураження судин на ранніх етапах захворювання та попереджати серцево-судинні ускладнення у пацієнтів з захворюваннями нирок.

Відомі способи, у яких, через методичні труднощі, використовують ряд опосередкованих ознак пошкодження ендотелію, за якими оцінюють як цілісність ендотеліального шару судинної стінки так і її функціональний стан. У якості опосередкованих ознак визначають: підвищення рівня фактору von Willebrand поряд з підвищенням активності m-кальпаїнів та кількості лейкоцитів з маркерами апоптозу CD-95. За змінами їх значень у хворих на ХХН опосередковано свідчать про підсилення відшарування судинного ендотелію та підвищення проникливості капілярів клубочків. (Peltier J., Bellocq A. Perez, J Calpain activation and secretaion promote gromerular injury in experimental glomerulonephritis: evidence from calpastatin-transgenetic mice // J. Am. Soc. Nephrol. - 2006. - Vol. 17, № 12. - P. 3415 - 3423).

(13) U

(11) 55271

(19) UA

Відомий також спосіб оцінки особливостей пошкодження судинного ендотелію у хворих на ХХН (И.И. Топчий. Взаимодействие макрофагов, тромбоцитов и клеток эндотелия как зеркало наших представлений об атеросклерозе в кардионефрологии // Український терапевтичний журнал - № 1 - 2008 - С. 9-18), обраний за прототип, у якому проводять загальноприйняті дослідження крові та сечі з визначенням у добовій сечі наявності або відсутності білку. У нормі білок у сечі практично відсутній (менш, ніж 0,002 г/л). Наявність білку у сечі (патологічна альбумінурія) пов'язана з патологією нирок і опосередковано свідчить про пошкодження структурної цілісності ендотеліального шару судинної стінки.

Загальним недоліком відомих способів та прототипу є те, що використання непрямих ознак не дає повного уявлення про особливості структурного пошкодження ендотелію та патологічних змін у судинах, що знижує об'єктивність оцінки. Іншим недоліком є відсутня можливість призначення патогенетично обґрунтованої терапії на ранніх стадіях захворювання, що підвищує ризик розвитку серцево-судинних ускладнень у хворих з захворюваннями нирок.

Задача корисної моделі - об'єктивувати оцінку шляхом вибору прямих маркерів особливостей структурного пошкодження ендотелію та проявів патологічних змін у судинах у хворих з захворюваннями нирок, ризик серцево-судинних ускладнень у яких особливо високий. А це дозволить призначати препарати, що впливають на механізми відшарування ендотелію, на більш ранній стадії захворювання нирок та здійснювати профілактику серцево-судинних ускладнень.

Задача вирішується шляхом удосконалення відомого способу оцінки особливостей пошкодження ендотелію при ХХН, який включає проведення загальноприйнятих досліджень крові та сечі з визначенням у сечі наявності або відсутності білку.

Ознаки, що відрізняють корисну модель від прототипу є такі:

- додатково, у якості прямих маркерів структурного пошкодження судинного ендотелію, визначають кількість циркулюючих злущених ендотеліальних клітин у збагаченій тромбоцитами плазмі та концентрацію розчиненого кадгерину судинного ендотелію (VE- кадгерину) у сироватці крові;
- здійснюють сумісну оцінку прямих маркерів структурного пошкодження судинного ендотелію;
- і якщо, у порівнянні з встановленою нормою, кількість циркулюючих злущених ендотеліальних клітин у 10 мкл збагаченої тромбоцитами плазмі та концентрація VE-кадгерину у сироватці крові підвищені не менш, ніж у 2 рази, свідчать про пошкодження цілісності ендотелію та наявність патологічних змін у судинах, які виражаються у порушенні міжклітинної адгезії судинного ендотелію, що є взаємопов'язаними та підсилюючими факторами ризику розвитку серцево-судинних ускладнень при хронічній хворобі нирок.

Доцільність вибору у якості прямих маркерів особливостей структурного пошкодження судинного ендотелію та патологічних змін у судинах хворих на ХХН (кількості циркулюючих у плазмі злущених ендотеліальних клітин та концентрація VE-кадгерину у сироватці крові) обумовлена наступним:

Ендотелію відводять роль органу внутрішньої секреції, регулюючого тонус судин, стан системи гомеостазу, процеси імунного та не імунного запалення. Порушення функції ендотелію є важливою ланкою патогенезу різних захворювань, у тому числі таких поширених, як артеріальна гіпертензія (АГ), ішемічна хвороба серця (ГКС), хронічні хвороби нирок (ХХН), гострий коронарний синдром (ГКС), атеросклероз, цукровий діабет. Ендотелій судин у нормі володіє високою антиагрегаційної, антикоагулянтної і фібринолітичної активністю (чинник Віллебранда, тканинний тромбопластин, інгібітор активатора плазміногену та ін.). Зниження тромборезистентності судинної стінки вносить істотний внесок в тромбогенез. Фатальні ускладнення атеросклерозу такі як ГКС, інсульт, обумовлені утворенням артеріального тромбу у місті структурного пошкодження ендотелію судин, що призводять до інвалідності хворих з судинною патологією, зокрема хворих з захворюваннями нирок, ризик серцево-судинних ускладнень у яких особливо високий.

Відомо, що порушення цілісності ендотелію і, як наслідок, порушення його проникливості залежить від структурних перебудов в організації контактів ендотеліальних клітин. Ендотеліальні клітини є однією з головних клітинних складових кровеносних судин, тому будь-які зміни в організації міжклітинних поєднань можуть мати складні наслідки, які будуть порушувати взаємодію ендотелію з елементами крові або модифікувати нормальну архітектуру стінки судин. [Telo P, Lostaglio S, Dejana E. Structure of intercellular junctions in the endothelium // Therapie. 1997; 52(5):395-8.2].

Досліджено, що кадгерини є важливою складовою частиною адгезивних контактів, відповідальних за організацію цитоскелету клітин. [Lampugnani MG, Caveda L, Breviario F, Del Maschio A, Dejana E. Endothelial cell-to-cell junctions. Structural characteristics and functional role in the regulation of vascular permeability and leukocyte extravasation. // Baillieres Clin Haematol. 1993 Sep; 6(3):539-58.]. VE-кадгерин опосередковує гомофільну агрегацію і злипання ендотеліальних клітин, що забезпечує неперервність ендотеліального моношару, і гальмує міграцію клітин через пошкоджену область [Jaap D. van Buul, Floris P. van Alphen, and Peter L. Hordijk The presence of alpha-catenin in the VE-cadherin complex is required for efficient transendothelial migration of leukocytes // Int J Biol Sci. 2009; 5(7): 695-705].

Метаболічні зміни, які лежать в основі відшарування ендотеліальних клітин та ураження судин, вивчені недостатньо. До недавнього часу роль судинної стінки при захворюваннях нирок в

значній мірі обмежували її участю в механізмах гемостазу.

У відомому рівні розвитку даної проблеми відсутні відомості щодо використання та сумісної оцінки вищенаведених прямих маркерів для оцінки особливостей структурного пошкодження ендотелію та проявів патологічних змін у судинах при ХХН. Тому актуальним та необхідним є розробка нових кількісних методів визначення особливостей уражень судин при ХХН на ранніх стадіях захворювання. Ступінь відтворюваності результатів при використанні корисної моделі - 95 %.

В умовах спеціалізованого відділення гіпертензій та захворювань нирок ДУ "Інститут терапії ім. Л.Т.Малої АМН України" згідно запропонованої корисної моделі були обстежені 80 пацієнтів на ХХН (38 чоловіків та 42 жінки) у віці від 42 до 68 років (середній вік $56 \pm 2,1$ роки), з яких у 35 хворих був діагностований хронічний гломерулонефрит (ХГН), у 26 - пієлонефрит, у 19 - гіпертонічна хвороба (ГХ). Контрольна група - 20 здорових осіб відповідної статі та віку.

Саме за власними даними оригінальних досліджень визначено, що пошкодження цілісності ендотеліального шару з підвищенням кількості злущених циркулюючих ендотеліальних клітин супроводжується порушенням міжклітинної адгезії судинного ендотелію, що є взаємопов'язаними та підсилюючими факторами ризику розвитку серцево-судинних ускладнень при хронічних захворюваннях нирок.

У запропонованій корисній моделі забезпечена можливість більш об'єктивно оцінювати особливості структурного пошкодження ендотелію, що дозволить ефективно відбирати хворих для призначення своєчасної патогенетично обґрунтованої терапевтичної стратегії. А це, в свою чергу, дозволить гальмувати ризик розвитку серцево-судинних ускладнень при ХХН.

Математичну обробку даних здійснено на персональному комп'ютері з використанням статичної програми "Statistica", 6.0. Вірогідність різниць оцінювали за критерієм t-Ст'юдента. Взаємозв'язок між показниками встановлювали за коефіцієнтом кореляції Пірсона.

Запропоновану корисну модель здійснюють таким чином:

Діагноз встановлюють на підставі аналізу скарг, анамнезу, даних клініко-інструментальних обстежень, при цьому використовують класифікацію, яка прийнята на II з'їзді нефрологів України (2005).

При обстеженні хворих на хронічні хвороби нирок проводять загальноприйняті дослідження крові та сечі з визначенням у добовій сечі наявності або відсутності білку за загально відомими якісним та кількісним методами Бранд-берга - Стольнікова (Ю.М. Неменова. Методы лабораторных клинических исследований // Москва. - Медицина". -1972 - с. 50-56). У нормі білок у сечі практично відсутній (менш, ніж 0,002 г/л). Наявність білку у сечі (патологічна альбумінурія) пов'язана з патологією нирок і опосередковано

свідчить про пошкодження структурної цілісності ендотеліального шару судинної стінки.

Згідно корисної моделі, додатково у якості прямого маркеру структурного пошкодження судинного ендотелію визначають кількість циркулюючих злущених ендотеліальних клітин. Для цього здійснюють забір цільної крові, з якої виділяють клітини ендотелію сумісно з тромбоцитами з подальшою стимуляцією агрегації тромбоцитів аде-нозиндифосфатом та виділяють утворені агрегати центрифугуванням за відомим методом (Hladovec, J. Circulating endothelial cells as a sign of vessels wall lesions // Physiologia bohemoslovaca. -1978. - Vol. 27.- P.400). Кількісний аналіз циркулюючих злущених ендотеліальних клітин здійснюють шляхом їх підрахування під флуоресцентним мікроскопом з визначенням середньої кількості ендотеліальних клітин у 10 мкл збагаченій тромбоцитами плазмі (ЗТП). При цьому фізіологічно нормальним вважають виявлення 4-5 ендотеліоцитів у 10 мкл ЗТП.

Далі у якості прямого маркеру структурного пошкодження ендотелію також визначають концентрацію розчинного VE-кадгерину у сироватці крові за допомогою стандартної тест-системи для імуноферментного аналізу виробництва Bender MetISystems (Австрія). Процедуру аналізу проводять відповідно вимогам інструкції, що надається до набору. Встановлена лабораторна норма концентрації розчинного VE-кадгерину - $(0,3 \pm 0,12)$ пг/мл. Здійснюють сумісну оцінку прямих маркерів структурного пошкодження судинного ендотелію.

І якщо, у порівнянні з встановленою нормою, кількість циркулюючих злущених ендотеліальних клітин у 10 мкл збагаченої тромбоцитами плазмі та концентрація VE-кадгерину у сироватці крові підвищені не менш, ніж у 2 рази, свідчать про пошкодження цілісності ендотелію та наявність патологічних змін у судинах, які виражаються у порушенні міжклітинної адгезії судинного ендотелію, що є взаємопов'язаними та підсилюючими факторами ризику розвитку серцево-судинних ускладнень при ХХН.

Ступень відтворюваності результатів при використанні корисної моделі - 95 %.

Можливість використання корисної моделі у медичній практиці підтверджується клінічними прикладами.

Приклад 1: Хворий П., чоловік, 52 роки, історія хвороби № 1263. Діагноз встановлюють на підставі аналізу скарг, анамнезу, даних клініко-інструментальних обстежень, загальноприйнятих біохімічних досліджень сироватки крові та сечі.

Скарги: на загальну слабкість, швидку стомлюваність; головні болі; періодично відчуття серцебиття; задишку при фізичних навантаженнях; набряки ніг,

Анамнез: Вважає себе хворим близько 3 років, коли при обстеженні з приводу підвищення АТ виявлені зміни в сечовому осаді, стали відмічатися набряки ніг, наростає задишка.

Об'єктивно: Загальний стан середньої тяжкості. Шкірні покриви і видимі слизисті звичайного забарвлення. Легені: перкуторно - легеневи

звук. Аускультативно - дихання везикулярне. Серце: перкуторні межі розширені вліво трохи. Аускультативно - тони ритмічні, приглушені, АТ 180/110 мм рт. ст., ЧСС 68 у хвилину. Живіт м'який, безболісний. Печінка у краю ребрової дуги. Селезінка не пальпується. Гомілки набрякли до середньої третини.

Симптом Пастернацкого негативний. Визначений рівень ШКФ 58 мл/хв (менш, ніж 90 мл/хв.), що свідчить про гіпофільтрацію тканин нирок.

Хворому проводять загальноприйняте дослідження сечі з визначенням наявності або відсутності білку у добовій сечі.

Результати: визначений білок - 0,56 г/л (норма - менш, ніж 0,002 г/л). Свідчать про наявність білку у сечі (патологічна альбумінурія), що вказує на патологію нирок і, опосередковано, на пошкодження структурної цілісності ендотеліального шару судинної стінки.

Встановлений діагноз: Хронічна хвороба нирок І ст., хронічний гломерулонефрит, фаза неповної ремісії. Артеріальна гіпертензія.

Згідно з корисною моделлю, для більш об'єктивної оцінки структурної цілісності ендотелію додатково проводять забір крові, виділяють та підраховують під мікроскопом кількість циркулюючих злущених ендотеліальних клітин у 10 мкл збагаченій тромбоцитами плазмі.

У сироватці крові визначають концентрацію розчинного кадгерину судинного ендотелію (VE-кадгерину).

Результати: визначено 17 циркулюючих злущених ендотеліальних клітин, що перевищує норму (4-5 клітин) у 3 рази. Концентрація VE кадгерину у сироватці крові дорівнює 0,95 пг/мл, яка перевищує норму (0,3±0,12 пг/мл) у 3 рази.

Приклад 2:

Хворий К., чоловік 68 років, історія хвороби № 845.

Діагноз встановлюють на підставі аналізу скарг, анамнезу, даних клініко-інструментальних обстежень, загальноприйнятих біохімічних досліджень сироватки крові та сечі.

Скарги: скаржився на швидку втому; загальну слабкість; іноді болі в області серця ниючого характеру; задишку при фізичних навантаженнях; болі в поперековій області періодично;

Анамнез: Вважає себе хворим з 1967 року, коли після перенесеної інфекції виявлені зміни в сечовому осаді, поставлений діагноз гломерулонефрит, підтверджений гістологічно після біопсії. Періодично обстежувався і лікувався амбулаторно і в стаціонарі. Гіпертонічна хвороба близько 10 років з прогресивним перебігом і мах АТ до 200/110 мм рт. ст. Близько 3 років відзначено підвищення рівня креатинину крові.

Об'єктивно: Загальний стан середньої тяжкості. Шкірні покриви і видимі слизисті звичайного забарвлення. Легені: перкуторно - легеневий звук. Аускультативно - дихання везикулярне. Серце: перкуторні межі трохи розширені вліво. Аускультативно - тони ритмічні, приглушені, АТ 200/110 мм рт. ст., ЧСС 56 в хвилину. Живіт м'який, безболісний. Печінка у краю ребрової дуги. Селезінка не пальпується. Периферичних набряків

немає. Симптом Пастернацкого негативний. Визначений рівень ШКФ 54 мл/хв (менш, ніж 90 мл/хв.), що свідчить про гіпофільтрацію тканин нирок.

Встановлений діагноз: Хронічна хвороба нирок І ст., хронічний гломерулонефрит, фаза неповної ремісії. Артеріальна гіпертензія. Хворому проводять загальноприйняте дослідження сечі з визначенням наявності або відсутності білку у добовій сечі.

Результати: визначені сліди білку у сечі - 0,039 г/л (норма - менш, ніж 0,002 г/л), що характеризують мікроальбумінурію. В той же час стан хворого у зв'язку з важкістю хронічного процесу у нирках може бути вкрай загрозливим.

Тому, згідно з корисною моделлю, для більш об'єктивної додатково проводять забір крові, виділяють та підраховують під мікроскопом кількість циркулюючих злущених ендотеліальних клітин у 10 мкл збагаченій тромбоцитами плазмі.

У сироватці крові визначають концентрацію розчинного кадгерину судинного ендотелію (VE-кадгерину). Здійснюють сумісну оцінку критеріїв особливостей структурного пошкодження ендотелію.

Результати: визначено 15 циркулюючих злущених ендотеліальних клітин, що перевищує норму (4-5 клітин) у 3 рази. Концентрація VE кадгерину у сироватці крові становить 0,83 пг/мл, що перевищує норму (0,3±0,12 пг/мл) у 2,5 рази.

Загальні висновки: У наведених клінічних спостереженнях наглядно показано, що у хворих на хронічний гломерулонефрит (ХГН) (клінічні приклади 1, 2) особливості порушення структурної цілісності судинного ендотелію корелюють із ступенем активності і тяжкістю захворювання. Одержані дані свідчать, що пошкодження структурної цілісності ендотеліального шару та інтенсивність процесу злущення ендотеліальних клітин у хворого (приклади 1, 2) супроводжується порушенням міжклітинної адгезії судинного ендотелію. Крім цього, у місті структурного пошкодження ендотелію судин може утворюватися артеріальний тромб. На підставі оцінки особливостей стану судинного ендотелію у хворого прогнозують високий ризик розвитку серцево-судинних ускладнень. Це може бути обумовлено тим, що за пошкодженням ендотеліального шару неминуче змінюється тонус судин, реологічні властивості крові; порушуються функціональні властивості та проникнення судинної стінки, що може загрожувати тромбоутворенням. Для зниження високого ризику розвитку судинних подій необхідно додатково до базисної терапії призначати лікарські засоби, що покращують функцію ендотелію судин.

За наведеними даними (приклад 2) можна заключити, що дослідження прямих маркерів може бути показано при виявленні тільки слідів білку. У цих випадках виявлені особливості стану судинного ендотелію можуть прояснювати наявну клінічну картину.

Таким чином, обрані оціночні критерії можуть слугувати важливими діагностичним і прогностичним тестом при розвитку судинних захворювань

або можуть використовуватися для контролю ефективності лікування цієї категорії хворих.

Технічний результат. Використання корисної моделі у медичній практиці, у порівнянні з прототипом, забезпечує вірогідне визначення ураження

судин на ранніх етапах захворювання, ефективний відбір хворих для призначення своєчасної патогенетично обґрунтованої терапевтичної стратегії та дозволяє запобігати серцево-судинним ускладненням у пацієнтів з захворюваннями нирок.