



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 105521

(13) U

(51) МПК

G01N 33/493 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**(21) Номер заявки: **u 2015 08776**(22) Дата подання заявки: **11.09.2015**(24) Дата, з якої є чинними  
права на корисну  
модель: **25.03.2016**(46) Публікація відомостей  
про видачу патенту: **25.03.2016, Бюл.№ 6**

(72) Винахідник(и):

**Черненко Василь Васильович (UA),  
Мигаль Людмила Якимівна (UA),  
Нікуліна Галина Григорівна (UA),  
Черненко Дмитро Васильович (UA),  
Желтовська Наталія Ігорівна (UA),  
Клюс Андрей Леонідович (UA),  
Негрей Лариса Миколаївна (UA),  
Сербіна Ірина Євгенівна (UA),  
Савчук Володимир Йосипович (UA)**

(73) Власник(и):

**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ  
УРОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ",  
вул. Ю. Коцюбинського, 9-а, м. Київ, 04053  
(UA)****(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ ІШЕМІЧНОГО УШКОДЖЕННЯ КАНАЛЬЦЕВОГО НЕФРОТЕЛІЮ У ХВОРИХ НА ФОСФОРНОКИСЛИЙ НЕФРОЛІТІАЗ**

(57) Реферат:

Спосіб діагностики ішемічного ушкодження каналцевого нефротелію у хворих на фосфорнокислий нефролітіаз включає визначення каналцевого лізосомного ферменту N-ацетил-β-D-глюкозамінідази у сечі із сечового міхура після фізіологічного сечовипускання. Сечу для аналізу отримують із ниркової миски під час оперативного втручання та додатково визначають активність лізосомного каналцевого ферменту β-галактозидази, і, якщо рівні активності ферменту N-ацетил-β-D-глюкозамінідази реєструють вищими за 17,1 мкмоль/год./ммоль креатиніну, а β-галактозидази вищими за 14,6 мкмоль/год./ммоль креатиніну, діагностують ішемічне ушкодження каналцевого нефротелію з боку ураження нирки конкрементом.

UA 105521 U



Корисна модель належить до галузі медицини, зокрема до урології, нефрології та клінічної біохімії, і може бути використана для діагностики ішемічного ушкодження каналцевого нефротелію у хворих на фосфорнокислий нефролітіаз, прогнозування перебігу хвороби та своєчасної оцінки ефективності його лікування.

5 Як відомо, в Україні на сечокам'яну хворобу хворіє біля 1 % дорослого населення. Щорічно реєструють зростання близько 2 % кількості первинних хворих, що перебувають на обліку. Остаточні результати лікування цієї поширеної патології, на жаль, не можна визнати цілком задовільними.

10 Вважається, що фосфорнокислий нефролітіаз за частотою рецидивування та тяжкістю перебігу хвороби серед усіх видів сечокам'яної хвороби займає провідне місце. Процеси рецидивування каменеутворення найбільш поширені саме серед хворих на фосфорнокислий нефролітіаз - 40-70 %, іноді досягаючи понад 10 епізодів протягом життя. Ситуація погіршується наявністю хронічного запального процесу в нирках. До особливостей перебігу фосфорнокислого нефролітіазу також належить швидкий ріст конкрементів без явної клінічної симптоматики у 15 більшості хворих, які не схильні до самостійного відходження на тлі ниркової кольки, що є більш притаманним для щавлевокислого та сечокиислового нефролітіазу. Перелічені патологічні зміни, що розвиваються у хворих на фосфорнокислий нефролітіаз, супроводжуються розладами інтраренальної гемодинаміки, порушенням мікроциркуляції, виникненням та прогресуванням гіпоксичних (ішемічних) процесів. Вищезазначене обумовлює актуальність своєчасної 20 діагностики ішемічного ушкодження паренхіми нирки у цих пацієнтів, що необхідно для вибору оптимальної тактики ведення цієї категорії хворих.

Відомо, що всі ферменти нирок є чутливими до гіпоксії, але реакція каналцевого апарата нефрону є найбільш ранньою і тому найбільш інформативною, а спровоковані гіпоксією порушення метаболізму в нирці можна виявити при дослідженні у сечі рівнів активності 25 ферментів, що локалізовані переважно у каналцевому нефротелії, особливо враховуючи органоспецифічність щодо нирок деяких із них, зокрема таких як N-ацетил-β-D-глюкозамінідаза та β-галактозидаза лізосомного походження, що розташовані переважно вздовж звивистих проксимальних каналців. За умов збереженої цілісності базальної мембрани клубочків ці ферменти з сироватки крові у сечу не потрапляють. Тому зміни рівнів активності цих ферментів 30 у сечі відбивають специфічні властивості саме для нирок, і несуть в собі об'єктивну клінічну та теоретичну інформацію, що характеризує зміни у функціональному стані нефроцитів каналцевого відділу нефрону при різних ниркових патологіях, в тому числі і при сечокам'яній хворобі.

Відомий спосіб діагностики порушень функції паренхіми нирок у дітей з патологією сечової системи [1], який полягає у визначенні ішемічних процесів у нирці з використанням цифрового обчислення даних ангіографії.

Недоліком способу є те, що цей метод не дозволяє виявляти ранні ішемічні зміни, тому що метаболічні порушення на клітинному рівні здійснюються задовго до того, як починають виявлятися патологічно порожні артеріоли, тобто на ранніх, початкових стадіях розвитку ішемії, 40 а тому цей метод є діагностично малоінформативним. Крім цього, у деяких випадках виконання ангіографії нирки не завжди є можливим через наявність ряду протипоказань як-то бронхіальна астма, тромбофлебіт нижніх кінцівок, алергічні реакції тощо.

Відомий також спосіб діагностики ішемії паренхіми нирки у хворих на односторонній уролітіаз із частковою обструкцією сечоводу [2], взятий за прототип, шляхом визначення у сечі хворих на сечокам'яну хворобу після фізіологічного сечовипускання рівнів активності каналцевого лізосомного ферменту N-ацетил-β-D-глюкозамінідази (ішемію паренхіми нирки діагностують при збільшенні рівня активності цього ферменту за верхню межу його контрольних значень).

Недоліком способу є те, що визначення тільки одного ферменту у сечі хворих для діагностики ішемічного ушкодження паренхіми нирки певною мірою обмежує його діагностичні 50 можливості. Недоліком даного способу також є те, що дослідження проводили у хворих із частковою обструкцією сечоводу, а, як вже зазначалось, хворі на фосфорнокислий нефролітіаз мають камені доволі великих розмірів, що не мають схильності до самостійного відходження.

В основу корисної моделі поставлена задача удосконалити спосіб діагностики ішемічного ушкодження каналцевого нефротелію у хворих на фосфорнокислий нефролітіаз шляхом 55 визначення рівнів активності каналцевих лізосомних ферментів N-ацетил-β-D-глюкозамінідази та β-галактозидази сечі і, залежно від рівнів активності цих ферментних показників щодо контрольних значень, більш об'єктивно діагностувати ішемічні порушення каналцевого нефротелію та визначити на цій підставі подальшу лікувальну тактику ведення цих хворих.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб діагностики ішемічного ушкодження каналцевого нефротелію у хворих на фосфорнокислий нефролітіаз, який включає визначення 60

канальцевого лізосомного ферменту N-ацетил-β-D-глюкозамінідази у сечі із сечового міхура після фізіологічного сечовипускання, згідно з корисною моделлю, сечу для аналізу отримують із ниркової миски під час оперативного втручання та додатково визначають активність лізосомного канальцевого ферменту β-галактозидази, і, якщо рівні активності ферменту N-ацетил-β-D-глюкозамінідази реєструють вищими за 17,1 мкмоль/год./ммоль креатиніну, а β-галактозидази вищими за 14,6 мкмоль/год./ммоль креатиніну, діагностують ішемічне ушкодження канальцевого нефротелію з боку ураження нирки конкрементом, що може бути використаним для більш об'єктивної ранньої діагностики метаболічних змін при фосфорнокислому нефролітіазі, своєчасного лікування ішемічних розладів та прогнозування подальшого перебігу хвороби.

Спосіб діагностики ішемічного ушкодження канальцевого нефротелію у хворих на фосфорнокислий нефролітіаз виконують наступним чином: з метою усунення впливу циркадних ритмів на екскрецію ферментів з сечею збирають вранішню порцію сечі без додавання консервантів, яку попередньо заморожують у морозильній камері. Після розморожування надлишок солей, який заважає визначенню активності ферментів, випадає в осад. Сечу після розморожування обов'язково збовтують, потім центрифугують 10 хвилин при 1500 обертах за хвилину або фільтрують.

Визначення активності N-ацетил-β-D-глюкозамінідази: в пробірку беруть 0,2 мл профільтрованої сечі і додають до них 0,3 мл 0,1М цитратного буферу (pH 4,15) та 0,2 мл субстрату, який включає 10 мМ розчину 4-нітрофеніл-2-ацетамідо-2-дезоксид-β-D-глюкопіранозиду у 0,1 М цитратному буфері (pH 4,15). При визначенні активності β-галактизидази в пробірку беруть 0,2 мл профільтрованої сечі і додають до них 0,3 мл 0,1 М цитратного буферу (pH 4,0) та 0,2 мл субстрату, який включає 5,0 мМ розчину p-нітрофеніл-p-β-D-галакто-піранозиду у 0,1 М цитратному буфері (pH 4,0). Подальший хід виконання ферментативних реакцій в пробах є загальним для визначення активності обох ферментів. Проби інкубують 30 хвилин при 37 °C, потім реакцію зупиняють додаванням 0,8 мл 0,1 М розчину вуглекислого натрію. Оптичну щільність пара-нітрофенолу, що утворився, вимірюють на фотоелектроколориметрі при 400 нм у кюветах з товщиною шару 3 мм проти контрольної проби, у яку розчин субстрату вносять після припинення ферментативної реакції. Мірою активності ферменту є кількість пара-нітрофенолу, що утворився в результаті ферментативної реакції. Кількість пара-нітрофенолу визначають за калібрувальною кривою, побудованою за стандартним розчином, що вміщує у пробі від 0,01 до 0,1 мкмоль пара-нітрофенолу. Активність N-ацетил-β-D-глюкозамінідази та β-галактизидази сечі розраховують у мкмольх пара-нітрофенолу, що утворився протягом 1 години, із розрахунку на 1 ммоль креатиніну сечі, вміст якого визначають загальновідомим методом за кольоровою реакцією Яффе з пікриною кислотою. Розрахунок активності ферментів у сечі на 1 ммоль креатиніну проводять для того, щоб зменшити вплив характеру діурезу на отримані результати та максимально наблизитися до стандартизації методів визначення ензимологічної активності у сечі, до того ж, як відомо, концентрація (вміст) креатиніну у сечі є відносно сталою величиною, що залежить, головним чином, від маси м'язової тканини та мало залежить від характеру харчування.

Апробація способу, що заявляється, проведена у відділах сечокам'яної хвороби, екстракорпоральної урології та літотрипсії та у лабораторії біохімії ДУ "Інститут урології НАМН України" у 118 хворих, які перебували в ДУ "Інститут урології НАМН України" протягом 2007-2013 рр. (дослідна група). Серед них - чоловіків 53,0±4,5 %, жінок - 47,0±4,5 %, переважний вік хворих перебував в межах 41-60 років. Первинно виявлений нефролітіаз був у 33 пацієнтів (27,9 %), рецидивний - у 85 (72,1 %). Тривалість хвороби коливалась від 1 до 8 років, кількість випадків рецидивування за цей період становила від 3 до 6, в середньому 3,8±0,9 епізодів. Також було досліджено 25 практично здорових осіб з нормальними аналізами сечі та без захворювань нирок в анамнезі (група контролю). У всіх пацієнтів камені були локалізовані з одного боку та не супроводжувалися атаками гострого або загостренням хронічного пієлонефриту. Функція нирок у хворих, що обстежувалися, була збережена.

Одержані результати показали, що у сечі осіб з групи контролю рівень активності N-ацетил-β-D-глюкозамінідази з урахуванням середньої арифметичної величини та її похибки ( $M \pm m$ ) дорівнює  $11,64 \pm 0,72$  мкмоль пара-нітрофенолу, що утворився за 1 годину із розрахунку на 1 ммоль креатиніну сечі. Середнє квадратичне відхилення ( $\sigma$ ) дорівнює 3,61. Активність β-галактозидази становить відповідно  $9,58 \pm 0,68$  мкмоль/год./ммоль креатиніну,  $\sigma = 3,37$ . Для визначення меж рівнів активності N-ацетил-β-D-глюкозамінідази та β-галактозидази у сечі практично здорових осіб (меж референтних інтервалів) використовують формулу  $M \pm 1,5 \sigma$  (3). З урахуванням величин середнього квадратичного відхилення ( $1,5 \sigma$ ) межі коливань для рівнів активності N-ацетил-β-D-глюкозамінідази становлять 6,2-17,1 мкмоль/год./ммоль креатиніну та

для рівнів активності  $\beta$ -галактозидази - 4,5-14,6 мкмоль/год./ммоль креатиніну відповідно. Отже, у тих випадках, коли рівні активності N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозамінідази у сечі хворих реєструються вищими за 17,1 мкмоль/год./ммоль креатиніну, а рівні активності  $\beta$ -галактозидази - вищими за 14,61 мкмоль/год./ммоль креатиніну, діагностують ішемічне ушкодження каналцевого нефротелію у хворих на фосфорнокислий нефролітіаз.

Встановлено, що у хворих на фосфорнокислий нефролітіаз (дослідна група), рівні активності N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозамінідази сечі за середніми даними дорівнюють  $30,90 \pm 1,23$  мкмоль/год./ммоль креатиніну, рівні активності  $\beta$ -галактозидази -  $16,81 \pm 0,92$  мкмоль/год. ммоль креатиніну, що є статистично вірогідно щодо відповідних результатів у сечі осіб з контрольної групи ( $p < 0,001$ ).

Отримані результати підтверджують правильність підходу до встановлення меж розподілу рівнів активності ферменту для порівняння між показниками пацієнтів дослідної групи (хворі на фосфорнокислий нефролітіаз) та показниками групи контролю.

Точність способу, тобто помилка у двох паралельних визначеннях активності N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозамінідази не перевищує  $\pm 5,3\%$ , активності  $\beta$ -галактозидази -  $\pm 4,5\%$ .

Наводимо приклад практичного застосування запропонованого способу.

Приклад. Хворий Х., 60 років, мед.к.стац.хв. № 2567. Клінічний діагноз: сечокам'яна хвороба, фосфорнокислий нефролітіаз, камінь правої нирки. Госпіталізований зі скаргами на тупий біль у правій поперековій ділянці. Хворіє протягом 7 років, неодноразово відмічав самостійне відходження дрібних конкрементів та "піску", що супроводжувалося нирковими кольками та загостренням хронічного пієлонефриту. Об'єктивно: стан задовільний, живіт при пальпації м'який, помірно болючий у правому підребер'ї, печінка, нирки, селезінка не пальпуються. С-м Пастернацького праворуч слабо позитивний. У загальному аналізі крові відмічають помірний лейкоцитоз, незначне підвищення ШОЕ. Біохімічні показники крові: креатинін та сечовина - в межах норми. В загальному аналізі сечі - лейкоцитурія, протеїнурія, бактеріурія; реакція сечі слабо кисла, в полі зору визначають незначну кількість аморфних фосфатів. За результатами бактеріологічного аналізу сечі виявлені представники кишкової флори (*Klebsiella* spp. - *Enterobacter* spp.). На оглядовій та екскреторній урограмах виявлено коралоподібний конкремент правої нирки розміром до 2,0 см. УЗД: права нирка - розширена порожнинна система, яка заповнена коралоподібним конкрементом розміром до 2,2 см, контрлатеральна нирка - без особливостей. За даними радіоізотопної ренографії (РРГ) функція правої нирки помірно знижена, функція лівої - збережена. Хворому виконана перкутанна нефролітотрипсія справа, під час якої була взята сеча для визначення активності N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозамінідази та  $\beta$ -галактозидази. За хімічним складом видалений камінь - гідроксилапатит (кальцію фосфат основний). За запропонованим способом проведено ензимологічне дослідження: рівні активності каналцевих лізосомних ферментів N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозамінідази та  $\beta$ -галактозидази у сечі з правої нирки становлять 25,02 та 17,12 мкмоль/год./ммоль креатиніну, тобто перевищують верхню межу контрольних значень (17,1 та 14,6 мкмоль/год./ммоль креатиніну відповідно), що свідчить про наявність ішемічних розладів у каналцевому нефротелії правої нирки. Ензимологічне дослідження через 1 тиждень після видалення конкременту: рівні активності N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозамінідази та  $\beta$ -галактозидази у сечі з правої нирки (сеча з нефростоми) становлять 18,12 та 11,03 мкмоль/год./ммоль креатиніну, тобто рівень активності N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозамінідази перевищує верхню межу контрольних значень, у той час як рівень активності  $\beta$ -галактозидази реєструють у межах контролю, що свідчить про виражену тенденцію до відновлення функціонального стану каналцевого нефротелію правої нирки. Рівні активності перелічених ензимологічних показників у сечі з лівої неушкодженої нирки (сеча після фізіологічного сечовипускання) реєструють у межах контролю (13,43 та 8,57 мкмоль/год./ммоль креатиніну відповідно). Рекомендовано: диспансерне спостереження уролога за місцем проживання, режим, дієта з урахуванням особливостей фосфорнокислого літіазу (виключення лужних мінеральних вод та цитрусових, різке обмеження молочних продуктів тощо), достатній водний режим - до 2,0-2,5 л/добу, канефрон Н, ЛаКрен (Кренмакс), запобігання фізичних навантажень та переохолоджень. Контрольне обстеження через 1 місяць (УЗД, загальні аналізи сечі та крові).

З наведеного прикладу видно, що застосування способу, що заявляється, дозволяє індивідуально у кожного хворого діагностувати ішемічні ушкодження каналцевого нефротелію з боку ураження конкрементом, що поряд з даними інших клініко-лабораторних, інструментальних та візуалізаційних методів дослідження, необхідно враховувати для оптимізації безпосередніх та віддалених результатів лікування. Також спосіб, що пропонується, за своєю інформативністю та доступністю виконання, може слугувати як індикатор відновлення функціональної здатності

ураженої нирки, тобто бути маркером ефективності відновлення функції нирки після видалення фосфорнокислого конкременту.

Вагома перевага способу, що заявляється, - це застосований методичний підхід до його виконання: одночасне визначення рівнів активності двох ферментів з певними реноспецифічними властивостями, що мають лізосомну локалізацію, але по-різному пов'язані зі структурними компонентами цієї органели, безпосередньо у сечі з ниркової миски з боку ураження конкрементом (під час оперативного втручання) та підвищення, таким чином, його діагностичних та прогностичних можливостей відносно об'єктивної інформації щодо ішемічного ушкодження каналцевого нефротелію у кожного хворого окремо.

Отже, спосіб діагностики ішемічного ушкодження каналцевого нефротелію у хворих на фосфорнокислий нефролітіаз є точним, безпечним для хворого (для аналізу використовується сеча), нескладним у виконанні, не потребує великої кількості біологічного матеріалу, добре відтворюваним та інформативним, діагностична ефективність способу дорівнює 93,1 %. Спосіб може бути використаним для корекції та оптимізації лікувальної тактики ведення хворих на фосфорнокислий нефролітіаз після видалення конкременту.

Джерела інформації:

1. Тихилова М.И. Оценка кровоснабжения почек у детей с помощью ЭВМ и ее клиническое значение // Хирургия. - 1990. - № 8. - С. 63-66.

2. Патент на КМ № 69689, UA, МПК G01N 33/493 (2006.01), A61P 13/12 (2006.01) Спосіб діагностики ішемії паренхіми нирки у хворих на односторонній уролітіаз / Возіанов С.О., Черненко В.В., Мигаль Л.Я., Нікуліна Г.Г., Ладнюк Р.Є., Желтовська Н.І., Ключ А.Л., Сербіна І.С., Негрей Л.М., Савчук В.Й.; u201112366, 21.10.2011. Опубл. 10.05.2012. Бюл. № 9. - 4 с. (прототип).

3. Власов В.В. Эффективность диагностических исследований. - М.: Медицина, 1988. - 180 с.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб діагностики ішемічного ушкодження каналцевого нефротелію у хворих на фосфорнокислий нефролітіаз, що включає визначення каналцевого лізосомного ферменту N-ацетил-β-D-глюкозамінідази у сечі із сечового міхура після фізіологічного сечовипускання, який **відрізняється** тим, що сечу для аналізу отримують із ниркової миски під час оперативного втручання та додатково визначають активність лізосомного каналцевого ферменту β-галактозидази, і, якщо рівні активності ферменту N-ацетил-β-D-глюкозамінідази реєструють вищими за 17,1 мкмоль/год./ммоль креатиніну, а β-галактозидази вищими за 14,6 мкмоль/год./ммоль креатиніну, діагностують ішемічне ушкодження каналцевого нефротелію з боку ураження нирки конкрементом.

---

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601