



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **70773**

(13) **U**

(51) МПК

**G01N 33/50** (2006.01)

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки:	<b>u 2011 14371</b>	(72) Винахідник(и):	<b>Варібрус Світлана Олександрівна (UA), Захаров Вадим Васильович (UA)</b>
(22) Дата подання заявки:	<b>05.12.2011</b>	(73) Власник(и):	<b>ДОНЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. М. ГОРЬКОГО, пр. Ілліча, 16, м. Донецьк, 83003 (UA)</b>
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель:	<b>25.06.2012</b>		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	<b>25.06.2012, Бюл.№ 12</b>		

## (54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ ГОСТРОГО КРИЗУ ВІДТОРГНЕННЯ НИРКОВОГО АЛОТРАНСПЛАНТАТА

### (57) Реферат:

Спосіб діагностики гострого кризу відторгнення ниркового алотрансплантата включає дослідження біологічної рідини. Як біологічну рідину використовують кров. Забір крові роблять до алотрансплантації донорської нирки, визначають сумарну концентрацію поліамінів та діагностують гострий криз відторгнення ниркового алотрансплантата.

**UA 70773 U**



Корисна модель належить до медицини, а саме до трансплантології, і може бути використана для діагностики гострого кризу відторгнення ниркового алотрансплантата.

Найближчим аналогом є відомий спосіб діагностики гострого відторгнення трансплантата нирки (1), в якому у реципієнта визначають добові екскреції із сечею імуноглобулінів G, трансферину,  $\alpha_1$ -мікроглобуліну,  $\beta_2$ -мікроглобуліну, мікроглобуліну, визначають відношення добової екскреції імуноглобулінів G до добової екскреції альбуміну та відношення екскреції імуноглобулінів G до загальної екскреції аналізованих білків та визначають коефіцієнти  $Z_1$  і  $Z_2$  за формулами:

$$Z_1 = -0,677 - 0,005 \cdot E_{\text{ім G}} + 0,014 \cdot E_{\alpha 1\text{м}} + 0,003 \cdot E_{\beta 2\text{м}} - 1,198 \cdot E_{\text{ім G/E альб}} + 25,888 \cdot E_{\text{ім G/E білків}}$$

$$Z_2 = -12,979 - 0,018 \cdot E_{\text{ім G}} + 0,053 \cdot E_{\alpha 1\text{м}} - 0,073 \cdot E_{\beta 2\text{м}} - 9,392 \cdot E_{\text{ім G/E альб}} + 162,251 \cdot E_{\text{ім G/E білків}},$$

де  $E_{\text{ім G}}$  - добова екскреція імуноглобулінів G (мг/доб.),

$E_{\alpha 1\text{м}}$  - добова екскреція  $\alpha_1$ -мікроглобуліну (мг/доб.),

$E_{\beta 2\text{м}}$  - добова екскреція  $\beta_2$ -мікроглобуліну (мг/доб.),

$E_{\text{ім G/E альб}}$  - відношення добової екскреції імуноглобулінів G до добової екскреції альбуміну,

$E_{\text{ім G /E білка}}$  - відношення добової екскреції імуноглобулінів G до загальної екскреції білків, та при величині  $Z_2 > Z_1$  діагностують гострий криз відторгнення нирки, концентрації імуноглобулінів G, трансферину, альбуміну,  $\alpha_1$ -мікроглобуліну,  $\beta_2$ -мікроглобуліну можуть бути визначені імунотурбідиметричним або нефелометричним способом.

Недоліки найближчого аналогу наступні: спосіб діагностики гострого відторгнення нирки за результатами визначення екскрецій сечі за добу імуноглобулінів G, трансферину, альбуміну,  $\alpha_1$ -мікроглобуліну,  $\beta_2$ -мікроглобуліну з використанням імунотурбідиметричним або нефелометричним способом може буди здійсненим тільки в умовах наявності діурезу після алотрансплантації донорської нирки. Тобто в умовах відсутності сечі при наявності стану первинно не функціонуючого алотрансплантата використання цього способу не можливе.

В основу корисної моделі поставлена задача створення способу діагностики гострого кризу відторгнення ниркового алотрансплантата, в якому забезпечується підвищення точності і вірогідності способу за рахунок дослідження сумарної концентрації поліамінів (сперміну, спермідину, путресцину) в крові до та в посттрансплантаційному періоді (2, 3).

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб діагностики гострого кризу відторгнення ниркового алотрансплантата, що включає вивчення концентрації креатиніну в плазмі крові, згідно з корисною моделлю, додатково у реципієнта виконують забір крові до алотрансплантації донорської нирки, а потім через кожні 72 години протягом першого місяця визначають сумарну концентрацію поліамінів - сперміну, спермідину, путресцину і у випадку, якщо концентрація сперміну досягає  $5,3 \pm 0,3$  нмоль/мл, спермідину  $29,2 \pm 9,2$  нмоль/мл, путресцину  $11,1 \pm 1,2$  нмоль/мл, а загальна концентрація поліамінів  $42,9 \pm 3,7$  нмоль/мл ставлять діагноз гострого кризу відторгнення ниркового алотрансплантата.

З патогенетичної точки зору це обумовлено тим, що поліаміни регулюють ДНК- і РНК-синтез і що концентрація їх збільшується при кризі відторгнення, в клітинах ниркового алотрансплантата та в активованих клітинах, які приймають участь в імунопатологічному процесі. Спермідин і спермін взаємодіють з ДНК, РНК і нуклеопротейдами, служать регуляторами активності топоізомераз, рестриктаз, а також ферментів біосинтезу ДНК і РНК, а спермідин, який є субстратом дезоксирибозинсинтети, необхідний для модифікації чинника ініціації трансляції eIF-5A.

Спосіб здійснюється таким чином: у реципієнта виконують забір крові до алотрансплантації донорської нирки, а потім через кожні 72 години протягом першого місяця визначають сумарну концентрацію поліамінів - сперміну, спермідину, путресцину. В пробірки вносять 2 мл біологічної рідини, доливають 15 % трихлороцетної кислоти, старанно змішують і ставлять в холодильник на 1 годину. Так скорочується час, необхідний на кислотний гідроліз, а також відпадає необхідність використання ампул. Потім проводять випарювання з використанням вакуумного насосу.

На змочену буферним розчином мембрану наносять за допомогою спеціального аплікатора через невеликі проміжки 4 дослідних і одну контрольну пробу, яка вміщує 1,5 нмоль/мл сперміну, 2,0 нмоль/мл путресцину. Мембрану розміщують в прилад для електрофорезу, заповнений лимоннокислим буфером (рН 3,6).

Електрофорез проводять при напрузі 320 В і силі струму 40 А протягом 2 хв. Потім мембрану виймають, наносять із пульверизатора нінгідриновий барвник і висушують протягом 5 хв. до появи забарвлення. Після цього опускають її на 10 хвилин в гліцериновий освітлюючий

розчин і сканують на денситометрі. Для того, щоб одержати не лише процентний вміст окремих фракцій, але і їх кількісні значення, сканування проводять в поперечному напрямі разом з контролем. Із процентного вмісту кожного із зразків і абсолютної кількості та процентного вмісту контролю, розраховують абсолютний вміст сперміну і путресцину в кожному зразку.

5 Аналіз даних сумарної концентрації поліамінів - сперміну, спермідину, путресцину в крові в нормі і у реципієнтів ниркових алотрансплантатів з різним перебігом раннього посттрансплантаційного періоду показав, що, якщо концентрація сперміну досягає  $5,3 \pm 0,3$  нмоль/мл, спермідину  $29,2 \pm 9,2$  нмоль/мл, путресцину  $11,1 \pm 1,2$  нмоль/мл, а загальна концентрація поліамінів  $42,9 \pm 3,7$  нмоль/мл, то ставлять діагноз гострого кризу відторгнення

10 ниркового алотрансплантата.  
Дослідження рівня поліамінів в сироватці та в еритроцитах виявили ідентичну спрямованість змін.

Статистична обробка результатів, одержаних при визначенні концентрації креатиніну, сечовини і рівня сперміну, спермідину, путресцину і загальної концентрації поліамінів у зразках сироватки крові реципієнтів з нормально функціонуючим трансплантатом при неускладненому перебігу раннього післяопераційного періоду показала, що величини їх рівнів відповідно були  $3,4 \pm 0,3$ ;  $16,7 \pm 0,2$ ;  $3,1 \pm 0,3$ ;  $23,2 \pm 0,5$  та в 94 % випадків відповідали концентраціям креатиніну і сечовини, що дорівнює відповідно 0,1 ммоль/л і 8,5 ммоль/л. У потенційних реципієнтів з термінальною стадією ХНН концентрація поліамінів в сироватки крові відповідно були  $3,8 \pm 0,5$ ;

20  $22,8 \pm 2,7$ ;  $4,1 \pm 0,2$ ;  $30,7 \pm 2,9$ .  
Дослідження рівня поліамінів у посттрансплантаційному періоді показали, що при первинній функції пересадженої нирки рівень поліамінів знижувався з перших післяопераційних днів. На 30 добу після операції показники поліамінів нормалізувались. При такому перебігу післяопераційного періоду зниження поліамінів проходило або паралельно із зниженням концентрації креатиніну і сечовини або випереджало їх на 1-6 днів.

Поява перших клінічних ознак гострого кризу супроводжувалась підвищенням рівня поліамінів: концентрація сперміну досягала  $5,3 \pm 0,3$  нмоль/мл, спермідину -  $29,2 \pm 3,2$  нмоль/мл, путресцину -  $11,1 \pm 1,2$  нмоль/мл. Загальна концентрація поліамінів -  $42,9 \pm 3,7$  нмоль/мл. Але подальші проведені дослідження показали, що тільки в 10 % випадків зростання рівня поліамінів спостерігалось одночасно з підвищенням концентрації креатиніну і сечовини, а в 90 % випадків їх рівень на 2-5 днів випереджав появу клінічних ознак.

У реципієнтів ниркових алотрансплантатів при гострому канальцевому некрозі концентрація сперміну досягала  $4,1 \pm 0,3$  нмоль/мл, спермідину -  $24,2 \pm 2,3$  нмоль/мл, путресцину -  $5,8 \pm 0,6$  нмоль/мл, Загальна концентрація поліамінів -  $34,1 \pm 3,1$  нмоль/мл.

35 Аналіз змін концентрації креатиніну і рівня поліамінів при кризі відторгнення, в залежності від функціонального стану трансплантата в цей період показав, що при розвитку реакції відторгнення на фоні олігоануричної фази гострого канальцевого некрозу, зростання рівня поліамінів у 85 % випадків на 1-2 дні випереджало появу інших ознак кризу.

40 При розвитку кризу відторгнення в стадії відновлення функції трансплантата, підвищення рівня поліамінів у 75 % випадків на 1-3 доби випереджало зростання концентрації сечовини і креатиніну.

При розвитку кризу відторгнення на фоні тривалого періоду нормального функціонування трансплантата зростання рівня поліамінів на 2-5 днів випереджало підвищення рівня азотистих шлаків.

45 Слід відмітити, що незворотними стали кризи, які супроводжувалися підвищенням загального рівня поліамінів більше ніж  $5,5 \pm 2,1$  нмоль/мл, при цьому концентрація креатиніну знаходилась в діапазоні від 0,63 до 0,91 ммоль/л.

При гострому канальцевому некрозі зниження рівня поліамінів починалось при відновленні функції трансплантата і в умовно-контрольні строки проходило паралельно із зниженням концентрації креатиніну і сечовини (25 % випадків) або відставало від цих показників на 2-5 днів (75 %). Повна нормалізація показників рівня поліамінів проходила тільки на 15-24 день після відновлення до норми показників азотемії.

У хворих з нефункціонуючим трансплантатом показники рівня поліамінів з першого післяопераційного дня залишались на рівні  $39,1 \pm 2,1$  нмоль/мл. Не дивлячись на корекцію гемодіалізом азотемії, рівень поліамінів не знижувався, а навпаки, була тенденція до його зростання.

55 При сандімуновій нефропатії рівень поліамінів складав відповідно: сперміну -  $4,2 \pm 0,4$  нмоль/мл, спермідину -  $23,1 \pm 3,5$  нмоль/мл, путресцину -  $5,2 \pm 0,2$  нмоль/мл, загальна концентрація поліамінів -  $32,5 \pm 4,0$  нмоль/мл.

При місцевій уроїнфекції рівень поліамінів складав відповідно, сперміну -  $4,6 \pm 0,2$  нмоль/мл, спермідину -  $15,4 \pm 0,4$  нмоль/мл, путресцину -  $7,7 \pm 0,3$  нмоль/мл, загальна концентрація поліамінів -  $28,7 \pm 0,6$  нмоль/мл (3).

При уросепсисі рівень поліамінів складав відповідно: сперміну  $7,8 \pm 1,1$  нмоль/мл, спермідину -  $39,6 \pm 3,9$  нмоль/мл, путресцину -  $17,2 \pm 1,7$  нмоль/мл, загальна концентрація поліамінів -  $64,6 \pm 5,1$  нмоль/мл (3).

Незважаючи на те, що підвищення рівня поліамінів не є патогномонічним для гострого кризу відторгнення (4), даний показник вказує на підсилену проліферацію та загибель клітин і його слід використовувати для моніторного спостереження і визначення тактики лікування (вибір варіанту введення Зенапакса, методів еферентної терапії, часу експлантації нирки при необоротності кризу відторгнення, призначення протикризкової терапії).

Таким чином, на основі сучасних даних про патогенез ускладнень раннього посттрансплантаційного періоду, а також в результаті математичної обробки лабораторних показників, встановлено, що вивчення динаміки концентрації в крові поліамінів - сперміну, спермідину і путресцину - низькомолекулярних регуляторів клітинного метаболізму, може бути використано як інформативні критерії дисфункцій ниркового алотрансплантата і в визначенні індивідуальних показань для призначення режиму імуносупресивної терапії. Підвищення сумарної концентрації поліамінів в крові при гострому канальцевому некрозі спостерігається в 1,5 разу, при гострому кризі відторгнення - в 1,9 разу, при сепсисі - в 2,8 разу.

Нижче наведений приклад, що ілюструє спосіб діагностики гострих кризів відторгнення ниркових алотрансплантатів.

Реципієнт В. 23 роки. Термінальна стадія хронічної ниркової недостатності з вересня 2005 року. Початок гемодіалізного лікування з листопаду 2005 року. Обстежена як потенційний реципієнт ниркового алотрансплантата, протипоказань для оперативного втручання не виявлено. 20.03.2006 р. визначені концентрації до операції креатиніну ( $0,86$  Ммоль/л), сечовини ( $32$  Ммоль/л) і рівня сперміну ( $3,75$  Нмоль/мл), спермідину ( $21,7$  Нмоль/мл), путресцину ( $4,0$  Нмоль/мл) і загальної концентрації поліамінів ( $29,45$  Нмоль/мл) у зразках сироватки крові реципієнта. 22.03.2006р. виконана алотрансплантація донорської нирки. В післяопераційному періоді мав місце ускладнений перебіг післяопераційного періоду, обумовлений гострим канальцевим некрозом. На третю добу на фоні анурії виконано чергове обстеження крові з визначенням рівня сперміну ( $4,0$  Нмоль/мл), спермідину ( $24,1$  Нмоль/мл), путресцину ( $5,8$  Нмоль/мл) і загальної концентрації поліамінів ( $33,9$  Нмоль/мл). Реципієнту виконана пункційна біопсія нирки. Висновок: гострий канальцевий некроз. Продовжене лікування програмним гемодіалізом.

На шосту добу рівень сперміну ( $5,4$  Нмоль/мл), спермідину ( $29,6$  Нмоль/мл), путресцину ( $11,7$  Нмоль/мл) і загальної концентрації поліамінів ( $46,7$  Нмоль/мл), що вказує на гострий криз відторгнення. Виконана повторна пункційна біопсія нирки. Висновок: гострий криз відторгнення. Результати визначення поліамінів після проведення курсу лікування гострого відторгнення: рівень сперміну ( $4,1$  Нмоль/мл), спермідину ( $24,0$  Нмоль/мл), путресцину ( $5,6$  Нмоль/мл) і загальної концентрації поліамінів ( $33,7$  Нмоль/мл), що вказує на ефективність лікування. При виконанні третьої пункційної біопсії одержаний висновок: ознак гострого кризу відторгнення не виявлено.

Відмічено появу та розвиток поліурії з нормалізацією показників азотемії (концентрація креатиніну  $0,11$  Ммоль/л та сечовини  $8,8$  Ммоль/л) та концентрації поліамінів в крові, рівень сперміну ( $3,8$  Нмоль/мл), спермідину ( $17,3$  Нмоль/мл), путресцину ( $3,6$  Нмоль/мл) і загальної концентрації поліамінів ( $24,7$  Нмоль/мл).

Перевага даного способу полягає в тому, що запропонований спосіб діагностики гострого кризу відторгнення є малоінвазивним. На відміну від пункційних біопсій він може проводитись кожні три доби протягом першого місяця після алотрансплантації донорської нирки. Це дозволяє оцінити стан ниркового алотрансплантата в динаміці, встановити причину дисфункції ниркового алотрансплантата та вирішити питання щодо оптимізації режиму ініціальної та базисної імуносупресивної терапії. Діагностична програма дозволяла точніше діагностувати криз відторгнення з  $62\%$  до  $90,5\%$ . Час, який був необхідний для проведення лабораторного комплексу диференційної діагностики, зменшився з 3-5 діб до 4 годин.

Джерела інформації, що прийняті до уваги:

1) Кишкун А.А. Руководство по лабораторным методам диагностики. М: ГЕОТАР - Медия.- 2007. 780 С.

2) Берко Е.М. Полиамины сыворотки крови и Эритроциты у больных уросепсисом. Вісник проблем біології і медицини.-1998. - № 23. - С. 56-59.

3) Баранова Ф.С., Мойсюк Я.Г. Иммунология в клинической аллотрансплантации органов. Иммунодепрессия. Трансплантология. Руководство под. редакцией В.И.Шумакова, - М: Медицина.-1995. - С. 62-71.

5

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

10

Спосіб діагностики гострого кризу відторгнення ниркового алотрансплантата, що включає дослідження біологічної рідини, який **відрізняється** тим, що як біологічну рідину використовують кров, забір крові роблять до алотрансплантації донорської нирки, а потім кожні 72 години протягом першого місяця, після чого визначають сумарну концентрацію поліамінів - сперміну, спермідину, путресцину, і, якщо концентрація сперміну досягає  $5,3 \pm 0,3$  нмоль/мл, спермідину  $29,2 \pm 9,2$  нмоль/мл, путресцину  $11,1 \pm 1,2$  нмоль/мл, а загальна концентрація поліамінів  $42,9 \pm 3,7$  нмоль/мл, діагностують гострий криз відторгнення ниркового алотрансплантата.

15

---

Комп'ютерна верстка М. Ломалова

---

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

---

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