



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **104977** (13) **C2**
(51) МПК (2014.01)
G01N 33/48 (2006.01)
A61B 10/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: а 2013 07248	(72) Винахідник(и): Пирогов Віктор Олексійович (UA), Мигаль Людмила Якимівна (UA), Нікуліна Галина Григорівна (UA), Нікітасв Сергій Вікторович (UA), Негрей Лариса Миколаївна (UA), Сербіна Ірина Євгенівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 07.06.2013	
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 25.03.2014	
(41) Публікація відомостей про заяву: 11.11.2013, Бюл.№ 21	(73) Власник(и): ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ УРОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ", вул. Ю. Коцюбинського, 9-а, м. Київ, 04053 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.03.2014, Бюл.№ 6	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: UA 53081 U; 27.09.2010 UA 36540 U; 27.10.2008 UA 32723 U; 26.05.2008

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ ЕФЕКТИВНОСТІ КОРЕКЦІЇ ПОРУШЕНЬ КРОВООБІГУ В ІШЕМІЗОВАНІЙ НИРЦІ

(57) Реферат:

Спосіб належить до галузі медицини, зокрема до урології, нефрології та біохімії, і може бути використаним для оцінки ефективності корекції порушень кровообігу на тлі розвитку ішемії паренхіми нирки в експерименті та прогнозування подальшого перебігу відповідних патологічних станів як в експерименті, так і в клініці. Спосіб включає визначення в корковому шарі паренхіми нирки із експериментально змодельованою ішемією активності лізосомного каналцевого ферменту β -галактозидази, де активність β -галактозидази визначають після введення в ішемізовану нирку розчину основного фактора росту фібробластів, отриманий результат ферментативної реакції розраховують на 1 г сирової тканини коркового шару паренхіми нирки і, якщо рівні активності ферменту реєструють вищими за середній їх рівень в корковому шарі паренхіми ішемізованих нирок на 30 % та більше, ефект корекції порушень кровообігу в нирках вважають досягнутим.

UA 104977 C2

Винахід належить до галузі медицини, зокрема до урології, нефрології та біохімії, і може бути використаним для оцінки ефективності корекції порушень кровообігу на тлі розвитку ішемії паренхіми нирки в експерименті та прогнозування подальшого перебігу відповідних патологічних станів як в експерименті, так і в клініці.

Згідно з сучасним уявленням, хвороби нирок незмінно супроводжуються порушенням внутрішньониркової гемодинаміки, що, як наслідок, призводить до виникнення та розвитку гіпоксичних (ішемічних) процесів в паренхімі нирки, тому проблема ішемії паренхіми нирки та, відповідно, її корекції, тобто корекції порушень внутрішньониркової гемодинаміки, на сьогодні займає важливе місце при вирішенні нагальних питань щодо подальшої тактики лікування хворих з патологією нирок. Дослідження в експериментальних умовах впливу нових лікувальних заходів, зокрема заходів корекції порушень внутрішньониркової гемодинаміки, як відомо, передують їх клінічним випробуванням і мати об'єктивні та інформативні критерії оцінки ефективності цих лікувальних заходів важливо. Як відомо, інтенсивність метаболічних процесів у паренхімі нирки повністю залежить від її кровопостачання, навіть незначне порушення якого одразу ж відбивається на функціональному стані її структурної одиниці - нефрону, та на рівнях активності тих ферментних систем, що приймають безпосередню участь у формуванні первинної сечі, тому реакція ферментів каналцевого апарата нефрону на гіпоксію є найбільш ранньою. У першу чергу це стосується змін гідролітичних ферментів в лізосомах, зокрема β -галактозидази, яка у високій концентрації є вміщеною в тканині паренхіми нирок та приймає безпосередню участь у тубулярному відділі нефрону у катаболізмі таких складних біополімерів як полісахариди, гліколіпіди та глікозаміног-лікани, відщепляючи від них галактозні залишки.

Відомий спосіб оцінки ефективності впливу імунотропної терапії на функціональний стан каналцевого нефротелію у дітей, хворих на гломерулонефрит з нефротичним синдромом (1), який полягає у визначенні у сечі дітей лізосомного каналцевого ферменту β -галактозидази після завершення курсу лікування та оцінці ефективності впливу імунотропної терапії на функціональний стан каналцевого нефротелію залежно від кількісних величин рівнів активності цього ферменту.

Недоліком способу є те, що він адаптований тільки для визначення активності ферменту в сечі, відповідно активність ферменту розраховують на 1 ммоль креатиніну сечі.

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб діагностики ішемії в паренхімі нирки, взятий нами за прототип (2), що полягає у визначенні у корковому шарі паренхіми нирок кролів після розвитку у них експериментально змодельованої ішемії активності лізосомного каналцевого ферменту β -галактозидази як маркера ішемічного стану паренхіми нирки, активність якого розраховують у відносних одиницях із урахуванням кількості мг білка у біологічному матеріалі, вміст якого визначають біуретовим методом.

Недоліком способу є те, що він тільки констатує наявність ішемічного ушкодження коркового шару паренхіми нирки після накладання лігатури на її верхній полюс, що стверджено результатами ангіографії та гістоморфологічно. Крім того, додаткове використання біуретового методу, за допомогою якого розраховують вміст білка у біологічному матеріалі для обчислення кінцевого результату ферментативної реакції, не завжди є інформативним у зв'язку з тим, що гомогенати із ниркової паренхіми іноді бувають не зовсім прозорими за рахунок опалесценції, що впливає на чутливість методу.

В основу винаходу поставлена задача удосконалити спосіб оцінки ефективності корекції порушень кровообігу в ішемізованій нирці шляхом визначення у корковому шарі паренхіми нирки кролів із експериментально змодельованою ішемією після введення в ішемізовану нирку розчину основного фактора росту фібробластів (bFGF), як засобу для корекції порушень кровообігу в нирках, рівня активності каналцевого лізосомного ферменту β -галактозидази і залежно від рівня цього ферменту оцінити ефект поліпшення функціонального стану каналцевого нефротелію та відповідно ефект корекції порушень кровообігу в паренхімі нирки з ішемією, що впливає на подальшу тактику лікування хворих з патологією нирок.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб оцінки ефективності корекції порушень кровообігу в ішемізованій нирці, який включає визначення в корковому шарі паренхіми нирки із експериментально змодельованою ішемією активності лізосомного каналцевого ферменту β -галактозидази, згідно з винаходом, активність лізосомного каналцевого ферменту β -галактозидази визначають після введення в ішемізовану нирку розчину основного фактора росту фібробластів, отриманий результат ферментативної реакції розраховують на 1 г сирової тканини коркового шару паренхіми нирки і, якщо рівні активності ферменту реєструють вищими за середній їх рівень в корковому шарі паренхіми ішемізованих нирок на 30 % та більше, ефект корекції порушень кровообігу в нирках вважають досягнутим.

Спосіб оцінки ефективності корекції порушень кровообігу в ішемізованій нирці виконують наступним чином:

- проводять експериментальне моделювання ішемії нирки за запропонованим способом (3) для створення контрольної групи кролів;

5 - застосовують основний фактор росту фібробластів (bFGF) для корекції порушень кровообігу в нирках (4) в дослідній групі;

10 - у корковому шарі паренхіми нирки кролів контрольної та дослідної груп здійснюють визначення активності лізосомного каналцевого ферменту β -галактозидази, для чого використовують 2,5 % гомогенат коркового шару паренхіми нирки, з якого готують 25 % розчин гомогенату таким чином: зважують на технічних вагах 1 г сирової тканини нирки, отриману наважку ретельно подрібнюють ножицями в чашці Петрі на льоду, потім ретельно розтирають скляним товкачиком в спеціальному скляному гомогенізаторі, розміщеному у посудині з льодом, додаючи холодний (0-2 °C) 0,9 % фізіологічний розчин, при цьому кількість фізіологічного розчину за своєю масою дорівнює трьом частинам наважки тканини нирки, тобто 3 мл, ретельно

15 перемішують, важливо, що всі процедури з наважкою тканини коркового шару нирки виконують якомога швидко та з обов'язковим використанням льоду, одержаний в такий спосіб 25 % розчин гомогенату тканини нирки далі розводять у 10 разів фізіологічним розчином, ретельно перемішують та центрифугують в центрифугальній пробірці при 3000 обертах за хвилину впродовж 10 хвилин для осадження залишків тканини, надосадову рідину зливають у окрему пробірку і вона являє собою 2,5 % розчин гомогенату коркового шару паренхіми нирки, який ще розводять у 2 рази 0,1 М цитратним буфером та ретельно струшують; надалі для визначення каналцевого лізосомного ферменту β -галактозидази використовують саме цей розведений вдвічі 2,5 % гомогенат паренхіми нирки: в пробірку беруть 0,2 мл гомогенату і додають 0,3 мл 0,1 М цитратного буферу рН 4,0 та 0,2 мл субстрату, який включає 5,0 мМ розчину 2-нітрофеніл-Р-0-галактопіранозиду у 0,1 М цитратному буфері рН 4,0, проби інкубують 30 хвилин при 37 °C, після зупинення ферментативної реакції додаванням 0,8 мл 0,1 М розчину вуглекислого натрію проби фільтрують, оптичну щільність р-нітрофенолу, що утворився в результаті ферментативної реакції, вимірюють на фотоелектроколориметрі при 400 нм в кюветах з товщиною шару 3 мм проти контрольної проби, в яку розчин субстрату вносять після

20 припинення ферментативної реакції, кількість р-нітрофенолу, що утворився в результаті ферментативної реакції, визначають за калібрувальною кривою, ферментативну активність β -галактозидази в паренхімі нирки з урахуванням ступеню розведення біоматеріалу розраховують у абсолютних одиницях - мкмольх р-нітрофенолу, що утворився протягом 1 години, із розрахунку на 1 г сирової тканини коркового шару паренхіми нирки.

35 Апробацію способу, що заявляється, проведено в лабораторії нейроурології та в лабораторії біохімії ДУ "Інституту урології НАМН України" на 25 експериментальних тваринах - статевозрілих кролях-самцях вагою у середньому $3,2 \pm 0,05$ кг. Контрольну групу (група № 1) складають 10 кролів з експериментально змодельованою ішемією лівою нирки, що розвинулася через 3,5-6,0 місяців після накладання лігатури на її верхній полюс, права (контрлатеральна)

40 нирка - інтактна; дослідну групу (група № 2) складають 9 кролів, яким на тлі експериментально змодельованої ішемії лівої нирки, що розвинулася через 3,5-6,0 місяців після накладання лігатури на її верхній полюс, з метою здійснення корекції порушень кровообігу в ліву дослідну нирку було введено розчин основного фактора росту фібробластів (bFGF); розвиток ішемії та, навпаки, ефект корекції порушень кровообігу в паренхімі нирок тварин підтверджено

45 результатами ангіографії та гістоморфологічно, права (контрлатеральна) нирка - інтактна; групу № 3 складають 3 здорових кроля, це 6 нирок.

Результати визначення активності лізосомного каналцевого ферменту β -галактозидази у корковому шарі паренхіми лівої (дослідної) та правої (інтактної) нирок кролів із контрольної - групи № 1, дослідної - група № 2 та групи № 3 - здорових кролів, наведені в таблиці.

50

Таблиця

Активність β -галактозидази в корковому шарі паренхіми нирки кролів ($M \pm m$)

№№	Групи кролів, що досліджувалися	Активність β -галактозидази паренхіми нирки (мкмоль/год. · г сирової тканини)		Статистичний показник
		Ліва нирка (дослідна - а)	Права нирка (інтактна - б)	
1	Контрольна група (n=10)	13,34 \pm 0,81(1a)	18,44 \pm 1,67(1б)	$p_{3-1a} < 0,01$ $p_{16-1a} < 0,02$
2	Дослідна група (n=9)	19,41 \pm 0,67(2a)	20,11 \pm 1,17(2б)	$p_{2a-1a} < 0,001$
3	Група здорових нирок кролів (n=6)	18,43 \pm 1,17		$p_{2a-2б} < -$ $p_{2a-3} < -$ $p_{2б-1б} < -$

Отримані результати свідчать, що рівні активності β -галактозидази в корковому шарі паренхіми нирок кролів, у яких через 3,5-8 місяців розвинулася ішемія (контрольна, група № 1) з урахуванням середньої величини та її похибки ($M \pm m$) статистично вірогідно знижена у порівнянні з аналогічним показником як з групи здорових кролів, так і з інтактною (контралатеральною) ниркою цих тварин ($p < 0,01$ та $< 0,02$). Групу кролів (дослідна, група № 2), які на тлі експериментально змодельованої ішемії отримують розчин основного фактора росту фібробластів, як засобу для корекції порушень кровообігу в нирках, характеризують статистично вірогідне підвищення рівнів активності β -галактозидази порівняно з аналогічним показником із контрольної - групи № 1 ($p < 0,001$), що свідчить про позитивний вплив препарату на функціональний стан паренхіми нирки, зокрема функціональний стан канальцевого відділу нефрону. Про цей факт також свідчить відсутність різниці в активності β -галактозидази між корковим шаром лівої та правої нирок в цій дослідній групі, а також відсутність різниці між рівнем активності цього ферменту в корковому шарі як лівої, так і правої нирки в цій групі тварин та рівнем активності ферменту у корковому шарі здорових кролів із групи № 3 (див. таблицю).

Індивідуальний аналіз отриманих результатів дослідження активності β -галактозидази у корковому шару паренхіми нирки тварин з дослідної групи показав, що зростання рівнів активності ферменту у цій групі кролів порівняно з середніми даними контрольної групи (13,34 \pm 0,81 мкмоль/год. · г сирової тканини) коливається від 30 % до 70 %, причому підвищення на 30 % спостерігають у 33,3 % експериментальних тварин, на 50 % та більше - у 55,6 %, в середньому у цій групі зростання активності ферменту у відношенні до аналогічного показника з групи контролю становить 46,12 \pm 5,0 %. Точність способу, тобто помилка у двох паралельних визначеннях, не перевищує $\pm 5,7$ %.

Отже, отримані результати підтверджують правильність підходу до вибору засобу для корекції порушень кровообігу в експериментально ішемізованих нирках.

Наводимо приклади застосування запропонованого способу.

Приклад 1. Із зразка тканини коркового шару паренхіми лівої (дослідної) та правої (інтактної) нирок кролика № 17 вагою 3150г, протокол від 02.02.2009 р., якому на тлі експериментально змодельованої ішемії верхнього полюсу лівої нирки (термін ішемії 5 місяців) введено розчин основного фактора росту фібробластів (bFGF), як засобу для корекції порушень кровообігу в нирках, готують 2,5 % розчин гомогенату, визначають активність β -галактозидази, яка у лівій нирці становить 20,72 мкмолей р-нітрофенолу, що утворився протягом 1 години, із розрахунку на 1 г сирової тканини коркового шару паренхіми нирки (мкмоль/год. · г сирової тканини), у правій нирці - 20,4 мкмоль/год. · г сирової тканини відповідно, розраховують відсоток збільшення рівню активності β -галактозидази лівої нирки порівняно із середнім значенням активності ферменту лівої нирки контрольної групи (13,34 \pm 0,81 мкмоль/год. · г сирової тканини), який становить 55,6 % та, згідно з запропонованим способом, роблять висновок про позитивний ефект корекції порушення кровообігу у паренхімі лівої нирки цієї тварини.

Приклад 2. Із зразку тканини коркового шару паренхіми лівої (дослідної) та правої (інтактної) нирок кролика № 27 вагою 3300 г, протокол від 25.03.2009 р., якому на тлі експериментально змодельованої ішемії верхнього полюсу лівої нирки (термін ішемії 4,5 місяці), згідно з запропонованим способом, введено розчин основного фактора росту фібробластів, як засобу для корекції порушень кровообігу в нирках, готують 2,5 % розчин гомогенату, визначають активність β -галактозидази, яка у лівій нирці становить 17,36 мкмолей р-нітрофенолу, що утворився протягом 1 години, із розрахунку на 1 г сирової тканини коркового шару паренхіми

нирки (мкмоль/год.·г сирої тканини), у правій нирці 23,24 мкмоль/год.·г сирої тканини відповідно, розраховують відсоток збільшення рівню активності β -галактозидази лівої нирки порівняно із середнім значенням активності ферменту лівої нирки контрольної групи ($13,34 \pm 0,81$ мкмоль/год.·г сирої тканини), який становить 30,8 % та роблять висновок про позитивний ефект корекції порушення кровообігу у паренхімі лівої нирки цієї тварини.

Приклад 3. Із зразку тканини коркового шару паренхіми лівої (дослідної) та правої (інтактної) нирок кролика № 35 вагою 3000г, протокол від 08.12.2009 р., якому на тлі експериментально змодельованої ішемії верхнього полюсу лівої нирки (термін ішемії 4 місяці), згідно з запропонованим способом, введено розчин основного фактора росту фібробластів як засобу для корекції порушень кровообігу в нирках, готують 2,5 % розчин гомогенату, визначають активність β -галактозидази, яка у лівій нирці становить 22,68 мкмоль р-нітрофенолу, що утворився протягом 1 години, із розрахунку на 1 г сирої тканини коркового шару паренхіми нирки (мкмоль/год.·г сирої тканини), у правій нирці - 24,92 мкмоль/год.·г сирої тканини відповідно, розраховують відсоток збільшення рівня активності β -галактозидази лівої нирки порівняно із середнім значенням активності ферменту лівої нирки контрольної групи ($13,34 \pm 0,81$ мкмоль/год.·г сирої тканини), який становить 70,8 % та роблять висновок про позитивний ефект корекції порушення кровообігу в паренхімі лівої нирки цієї тварини.

Спосіб, що заявляється, може бути використаним в експериментальних умовах для оцінки ефективності нових медикаментозних засобів, зокрема засобів для корекції порушень кровообігу в нирках, а також для оцінки ефективності застосування хірургічної корекції порушень кровообігу нирки та прогнозування подальшого перебігу патологічних станів в нирці як в експерименті, так і в клініці, також може слугувати експериментальним обґрунтуванням досліджень щодо визначення та інтерпретації особливостей змін рівнів активності β -галактозидази в сечі з метою ранньої діагностики та своєчасного лікування ішемічних розладів в паренхімі нирок як у дослідних тварин, так і у клінічних умовах. Подальше визначення активності ферменту як маркера ішемічного ушкодження нирки у сечі, - неінвазивний та доступний метод, в умовах клініки може бути використаним для поглибленого вивчення ступеня порушення функціонального стану паренхіми нирки за різних варіантів її патології та своєчасної оцінки їх корекції.

Таким чином, спосіб оцінки ефективності корекції порушень кровообігу в ішемізованій нирці є точним, нескладним у виконанні, не потребує великої кількості біологічного матеріалу, добре відтворюваним та діагностично інформативним: діагностична специфічність способу дорівнює 100 %, діагностична чутливість - 83 % діагностична ефективність - 94 %.

Джерела інформації:

1. Пат. № 53081, UA, МПК(2006.01) G01N 33/493, А 61 Р 13/12. Спосіб оцінки ефективності впливу імунотропної терапії на функціональний стан канальцевого нефротелію у дітей, хворих на гломерулонефрит з нефротичним синдромом /С.П. Фоміна, І.В. Багдасарова, Л.Я. Мигаль, Л.В. Король, Л.В. Попова; ДУ "Ш АМНУ"; № u201002753, 11.03.2010. Опубл. 27.09. 2010, Бюл. № 18. – 5 с.

2. Пат. № 36540, UA, МПК (2006), G01N 33/48. Спосіб діагностики ішемії паренхіми нирки /В.О. Пирогов, Л.Я. Мигаль, Г.Г. Нікуліна, С.В. Нікітаєв, Л.М. Негрей; ДУ "ТУ АМНУ"; № u200807888, 10.06.2008. Опуб. 27.10.2008, Бюл. № 20. – 3 с. (прототип).

3. Пат. № 65480, UA, МПК (2006.01) G09B 23/28. Спосіб моделювання ішемії нирки /О.Ф. Возіанов, В.О. Пирогов, В.І. Зубко, С.В. Нікітаєв, А.М. Романенко, Г.Г. Нікуліна, С.В. Базалицька, Л.М. Негрей, Л.Я. Мигаль, І.Є. Сербіна, В.С. Недельчев, Ю.О. Салинко, В.В. Білоголовська, Р.В. Гуц, Ю.М. Згонник, О.С. Сабадаш, ЯМ. Клименко; ДУ "ІУ АМНУ"; № u201105548, 04.05.2011. Опуб. 12.12.2011, Бюл. № 23. – 2 с.

4. Пат. № 26456, UA, МПК(2006), А 61 К 38/18. Застосування основного фактора росту фібробластів (bFGF) для корекції порушень кровообігу в нирках /О.Ф. Возіанов, В.А. Кордюм, В.О. Пирогов, А.М. Романенко, В.І. Зубко; № u200704481, 23.04.2007. Опуб. 25.09. 2007, Бюл. № 15. – 7 с.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Спосіб оцінки ефективності корекції порушень кровообігу в ішемізованій нирці, який включає визначення в корковому шарі паренхіми нирок кролів із експериментально змодельованою ішемією активності лізосомного канальцевого ферменту β -галактозидази, який **відрізняється** тим, що активність лізосомного канальцевого ферменту β -галактозидази визначають після введення в ішемізовану нирку розчину основного фактора росту фібробластів, отриманий результат ферментативної реакції розраховують на 1 г сирої тканини коркового шару паренхіми

нирки і, якщо рівні активності ферменту реєструють вищими за середній їх рівень в корковому шарі паренхіми ішемізованих нирок групи контролю на 30 % та більше, ефект корекції порушень кровообігу в нирках вважають досягнутим.

Комп'ютерна верстка Д. Шеверун

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