



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **82540** (13) **U**  
(51) МПК (2013.01)**G01N 33/53** (2006.01)**G01N 33/48** (2006.01)**G01N 35/00****A61P 13/12** (2006.01)**A61P 37/02** (2006.01)ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ****(21)** Номер заявки: **u 2013 04530****(22)** Дата подання заявки: **11.04.2013****(24)** Дата, з якої є чинними  
права на корисну  
модель: **12.08.2013****(46)** Публікація відомостей  
про видачу патенту: **12.08.2013, Бюл.№ 15****(72)** Винахідник(и):**Дріянська Вікторія Євгенівна (UA),  
Король Леся Вікторівна (UA),  
Мигаль Людмила Якимівна (UA),  
Гайсенюк Федір Зіновійович (UA),  
Степанова Наталія Михайлівна (UA),  
Романенко Оксана Антонівна (UA)****(73)** Власник(и):**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ  
НЕФРОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ",  
вул. Дегтярівська, 17-в, м. Київ, 04050 (UA)****(54) СПОСІБ КОРЕКЦІЇ ІМУНОЛОГІЧНИХ ТА БІОХІМІЧНИХ ПОРУШЕНЬ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ПІЄЛОНЕФРИТ З РЕЦИДИВУЮЧИМ ПЕРЕБІГОМ****(57)** Реферат:

Спосіб корекції імунологічних та біохімічних порушень у хворих на хронічний пієлонефрит з рецидивуючим перебігом включає традиційну антибактеріальну терапію, додаткове застосування препарату імуномодуючої дії. Як імуномодуючий лікарський засіб внутрішньо застосовують Нуклеїнат у дозі 0,25 г 4 рази на добу протягом 14 днів та при зниженні у крові рівнів фактора некрозу пухлин- $\alpha$  та моноцитарного хемоатрактантного протеїну-1 більше ніж на 30 % та більше від вихідних даних, а також при визначенні активності  $\beta$ -галактозидази сечі у межах від 4,5 до 14,6 мкмоль/год/ммоль креатиніну і відсутності реєстрації активності трансамідази сироватки крові ефект корекції імунологічних та біохімічних порушень вважають досягнутим.

**UA 82540 U**



Спосіб належить до медицини, а саме до нефрології, клінічної імунології та біохімії, і може бути використаний для підвищення ефективності терапії хворих на хронічний пієлонефрит з рецидивуючим перебігом.

Пієлонефрит є одним з найпоширеніших інфекційних захворювань та становить серйозну економічно-соціальну проблему охорони здоров'я як в Україні, так і у всьому світі. Більш ніж у 30 % хворих, які перенесли гострий пієлонефрит, розвивається рецидивуючий перебіг захворювання (більше 3 епізодів протягом року). Лікування пієлонефриту базується на застосуванні антимікробної терапії. Втім, у разі рецидивуючого перебігу пієлонефриту антибактеріальні лікарські засоби використовуються як для лікування, так і для профілактики захворювання, що призводить до появи полірезистентних штамів бактерій, постійної персистенції збудників та вторинного імунодефіциту. На сьогодні є доведеним, що недостатність місцевого та загального імунітету у хворих на пієлонефрит є важливою складовою розвитку рецидивуючого перебігу захворювання. Саме тому застосування препаратів імуномодуючої дії з метою корекції патологічних зсувів за рахунок підвищення резистентності організму у цієї категорії хворих набувають надзвичайної актуальності.

Відомий спосіб комплексної терапії хронічного пієлонефриту (1), який включає доповнення загальноновизнаної схеми антибактеріального лікування препаратом імуновіт. Імуновіт є флавоноїдним глікозидом, до складу якого входять рутозид 25 мг та аскорбінова кислота 100 мг і має здатність поглинати вільні радикали, гальмувати перекісне окислювання ліпідів та є стимулятором Т-клітинної ланки імунітету, його призначають по 1 т 3 рази на добу, протягом місяця, що сприяє швидкому покращенню самопочуття хворих, зниженню рівнів лейкоцитурії та бактеріурії.

Недоліками способу є те, що цей препарат протипоказаний пацієнтам, що отримують сульфаніламідів та антибіотики групи аміноглікозидів, які є препаратами вибору у хворих на хронічний пієлонефрит. Крім цього імуновіт не впливає на цитокінову ланку імунітету, яка відіграє важливу роль в патогенезі інфекційно-запальних захворювань.

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб лікування хворих на хронічний пієлонефрит, взятий нами за найближчий аналог (2), який включає поряд із антибактеріальною терапією додаткове застосування розчину препарату Протефлазид рослинного походження, що має протівірусну та імуномодуючу дію, 3 рази на день за наступною схемою: на 1-й тиждень лікування по 5 крапель (0,2 мл), нанесеними на грудочку, цукру або хліба, на 2 та 3-й тиждень - по 10 крапель (0,4 мл), на 4-й тиждень - по 8 крапель (0,3 мл).

Недоліками способу є незручність його застосування для хворої людини (3 рази на добу препарат необхідно крапати на шматочок цукру або хліба), особливо в умовах великого мегаполіса, беручи до уваги той факт, що на хронічний пієлонефрит з рецидивуючим перебігом найчастіше хворіють жінки молодого працездатного віку, які переважно лікуються амбулаторно. До недоліків способу належить також його відносно висока собівартість.

В основу корисної моделі поставлена задача удосконалити спосіб корекції імунологічних та біохімічних порушень у хворих на хронічний пієлонефрит з рецидивуючим перебігом шляхом доповнення схеми антибактеріальної терапії препаратом Нуклеїнат (натрієва сіль нуклеїнової кислоти), що має імуномодуючу дію з метою підвищення ефективності лікування за рахунок позитивного впливу на функціональну активність імунокомпетентних клітин крові та функціональний стан канальцевого відділу нефрону, для цього до та після лікування, як критерії імунологічних та біохімічних порушень, визначають сироватковий рівень прозапальних цитокінів - фактор некрозу пухлин-альфа і моноцитарний хемоатрактантний протеїн-1 та показники реноспецифічної ферментурії та ферментемії, зокрема активність канальцевих ферментів лізосомного ( $\beta$ -галактозидази сечі) та мітохондріального (трансамідази сироватки крові) походження, що дасть можливість залежно від кількісних величин прозапальних цитокінів і показників ферментурії та ферментемії своєчасно дати оцінку ефективності терапії, що була застосована, щодо впливу її на патологічний процес в організмі в цілому та в нирках хворих на хронічний пієлонефрит з рецидивуючим перебігом зокрема, та використовувати одержані дані для подальшої оптимізації лікувальної тактики ведення таких хворих та зниження частоти рецидивів захворювання.

Препарат Нуклеїнат має здібність нормалізувати клітинний імунітет, підвищуючи міграцію і кооперацію Т- і В-лімфоцитів і фагоцитарну активність макрофагів, пригнічує підвищену агрегацію тромбоцитів та проявляє протизапальну активність, що призводить до посилення неспецифічної резистентності організму до вірусної та бактеріальної інфекції, нормалізації імунного статусу людини, прискорення процесів регенерації, підвищення енергозабезпечення клітин шляхом стимулювання синтезу макроергічних сполук, пригнічення окислювальних процесів в

клітинних мембранах, їх стабілізації, оптимізації окислювально-відновних процесів та посилення антиоксидантної активності в тканинах.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб корекції імунологічних та біохімічних порушень у хворих на хронічний пієлонефрит з рецидивуючим перебігом, що включає традиційну антибактеріальну терапію, доповнену застосуванням препарату імуномодуючої дії, згідно з корисною моделлю, як імуномодуючий лікарський засіб внутрішньо застосовують Нуклеїнат у дозі 0,25 г 4 рази на добу протягом 14 днів та при зниженні у крові рівнів фактора некрозу пухлин- $\alpha$  та моноцитарного хемоатрактантного протеїну-1 більше ніж на 30 % та більше від вихідних даних, а також при визначенні активності  $\beta$ -галактозидази сечі у межах від 4,5 до 14,6 мкмоль/год./ммоль креатиніну і відсутності реєстрації активності трансамідази сироватки крові ефект корекції імунологічних та біохімічних порушень вважають досягнутим.

Спосіб корекції імунологічних та біохімічних порушень у хворих на хронічний пієлонефрит з рецидивуючим перебігом виконують наступним чином: на фоні антибактеріальної терапії (хінолони, цефалоспорины, нітрофураны, один з яких використовують, згідно зі встановленою чутливістю виявлених збудників) призначають препарат Нуклеїнат у дозі 0,25 г, 4 рази на добу протягом 14 днів, побічних реакцій препарату не зафіксовано;

- вміст цитокінів (фактор некрозу пухлин-альфа і моноцитарний хемоатрактантний протеїн-1) визначають за допомогою імуноферментного аналізу, згідно з інструкцією виробника;

- для визначення активності ферменту  $\beta$ -галактозидази 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 розчин 2-нітрофеніл- $\beta$ -D-галактопіранозиду у 0,1 М цитратному буфері pH 4,0, проби інкубують 30 хв. при 37 °С, ферментативну реакцію зупиняють додаванням 0,8 мл 0,1 М розчину вуглекислого натрію, оптичну щільність пара-нітрофенолу, що утворився, вимірюють на фотоелектроколориметрі при 400 нм проти контрольної проби, у яку розчин субстрату вносять після припинення ферментативної реакції, активність  $\beta$ -галактозидази сечі розраховують у мкмольх пара-нітрофенолу, що утворився протягом 1 години, із розрахунку на 1 ммоль креатиніну сечі, вміст якого визначають за кольоровою реакцією Яффе з пікріновою кислотою;

- для визначення активності трансамідази в центрифужну пробірку вносять 0,35 мл 0,007М розчину L-канаваніну- $H_2SO_4$  (готують на 0,14М фосфатному буфері, pH 7,5), 0,35 мл 0,007М розчину L-орнітину-HCl (готують на 0,14М фосфатному буфері, pH 7,5) та здійснюють преінкубацію протягом 15 хв. при 37 °С у водяній бані, потім у дослідну пробу вносять 0,2 мл сироватки крові, суміш інкубують протягом 60 хв. при 37 °С, у контрольну пробу джерело ферменту (сироватку крові) додають після інкубації, реакцію зупиняють додаванням 0,1 мл 50 % розчину трихлороцтової кислоти, для осадження білків проби центрифугують при 3000 об./хв. 20 хв., потім по 0,5 мл надосадової рідини із дослідної та контрольної проб відбирають у окрему пробірку, доводять водою до 1,0 мл та здійснюють колориметричне визначення L-аргініну, що утворився в результаті ферментативної реакції, за модифікованою реакцією Сакагучи, для чого до 1,0 мл розчину, що вміщує L-аргінін у дослідній та контрольній пробах, додають 2,0 мл розчину 2N NaOH, енергійно струшують та приливають 1,0 мл 0,02 % розчину 8-оксихіноліну (готують перед застосуванням із 0,2 % спиртового розчину шляхом розведення водою у 10 разів), ретельно перемішують і вносять по 1,0 мл гіпоброміту натрію (готують шляхом додавання 0,05 мл бром до 100 мл 0,5N NaOH), негайно струшують та відразу добавляють по 1,0 мл 40 % розчину сечовини (реактиви для здійснення реакції Сакагучи обов'язково тримають у холодильній камері), колориметрують через 6-10 сек. на фотоелектроколориметрі при 490 нм (кувети - 10 мм) проти води, колір розчину, що утворився в результаті ферментативної реакції, при кімнатній температурі не є стійким, але є стійким протягом декількох годин, якщо проби помістити у льодяну баню, активність трансамідази є пропорційною різниці екстинцій між дослідним та контрольним визначеннями, вміст L-аргініну, що утворився під час ферментативної реакції, визначають за калібрувальним графіком. Активність ферменту виражають у ммольх L-аргініну, що утворився за 1 годину інкубації при 37 °С, із розрахунку на 1 л сироватки крові; вміст цитокінів у сироватці крові, активність  $\beta$ -галактозидази сечі та активність трансамідази сироватки крові визначають до та після завершення курсу лікування.

Апробацію запропонованого способу проведено у відділенні нефрології та діалізу і лабораторіях імунології та біохімії ДУ "Інститут нефрології НАМН України" у 55 жінок, хворих на хронічний рецидивуючий пієлонефрит, з яких 30 пацієнток на фоні антибактеріального лікування отримують, за запропонованим способом, препарат Нуклеїнат (дослідна група) та 25 жінок склали групу порівняння, тобто отримували тільки антибактеріальні препарати. Критеріями включення до дослідження були наявність бактеріурії  $\geq 10^5$  КУО/мл та часте рецидивування захворювання (більше 3 разів на рік). Контрольну групу склали 25 умовно

здорових осіб. Групи, що досліджувалися, за статтю та віком поміж собою практично не відрізнялися.

Аналіз показників прозапальних цитокінів методом імуноферментного аналізу, що представлені у таблиці, показав достовірне зниження у сироватці крові хворих, що отримували Нуклеїнат, середніх рівнів фактора некрозу пухлин-альфа та моноцитарного хемоатрактантного протеїну-1 ( $p < 0,001$ ). В групі порівняння зміни цих медіаторів запалення недостовірні (відповідно,  $p = 0,988$  та  $p = 0,234$ ). Індивідуальний аналіз показників показав, що після лікування у 100 % хворих дослідної групи відбувалось зниження вмісту фактора некрозу пухлин-альфа та у 92 % - моноцитарного хемоатрактантного протеїну-1, тоді як в групі порівняння зниження рівнів цих цитокінів зареєстровано лише у 70 % хворих ( $p < 0,001$ ).

Таблиця

Порівняльні дані показників фактора некрозу пухлин-альфа і моноцитарного хемоатрактантного протеїну-1 до та після лікування в групах хворих, що отримують тільки антибактеріальну терапію (група порівняння) і антибактеріальну терапію+препарат Нуклеїнат (дослідна група)

Групи хворих	Показник					
	фактора некрозу пухлин-α			моноцитарного хемоатрактантного протеїну-1		
	до лікування	після лікування	статист. показник	до лікування	після лікування	статист. показник
Група порівняння (n=25)	68,8 (39,8-99,1)	74,9 (45,0-121,2)	$p=0,988$	232,8 (140,8-462,7)	105,5 (68,4-282,8)	$p=0,234$
Дослідна група (n=30)	87,8 (70,7-94,3)	63,1 (57,8-73,9)	$p < 0,001$	211,7 (154,4-297,2)	122,0 (110,3-182,0)	$p < 0,001$

Що стосується активності β-галактозидази, то у сечі жінок контрольної групи з урахуванням середньої арифметичної величини та її похибки ( $M \pm m$ ) вона дорівнює  $9,58 \pm 0,68$  мкмоль/год./ммоль креатиніну,  $\sigma = 3,37$ . Межі фізіологічних або контрольних коливань для рівнів активності β-галактозидази з урахуванням середнього квадратичного відхилення -  $M \pm 1,5 \sigma$  (3), величини, що характеризує ступінь варіювання будь-якого показника, становлять від 4,5 до 14,6 мкмоль/год./ммоль креатиніну. Тобто, якщо активність β-галактозидази сечі реєструють в інтервалі від 4,5 до 14,6 мкмоль/год./ммоль креатиніну, то чисельні рівні їх активності відповідають фізіологічним або контрольним значенням. У більшості обстежених жінок активність β-галактозидази сечі була нижче нормальних (контрольних) величин, що пояснюють зниженням насамперед місцевого імунітету, тому у даному випадку під позитивним впливом лікувального засобу розуміють підвищення досліджуваного показника після лікування, якщо його вихідні дані нижче нормальних величин та зниження відповідного показника після лікування, якщо його вихідні дані були більші за показники норми. Результати досліджень показали, що у сироватці крові здорових жінок активність трансамідази не реєструють, тобто вона дорівнює 0. У сироватці крові жінок з рецидивуючим перебігом хронічного пієлонефриту активність трансамідази до лікування становить у середньому  $0,504 \pm 0,012$  ммоль/(год.·л), що вказує на активність запального процесу та підтверджує діагноз пієлонефриту у цих пацієнток.

Застосування Нуклеїнату позитивно впливає і на зміни рівнів активності ензимологічних показників. Так, позитивна динаміка змін активності β-галактозидази сечі встановлена у 55 % хворих дослідної групи проти 25 % хворих групи порівняння ( $p = 0,02$ ), змін активності трансамідази сироватки крові - у 69 % хворих дослідної групи та у 42 % хворих групи порівняння ( $p = 0,04$ ).

Точність способу: похибка у двох паралельних визначеннях для активності трансамідази сироватки крові не перебільшує  $\pm 5,7$  %, для активності β-галактозидази сечі -  $\pm 3,3$  %.

Отже, доповнення антибактеріальної терапії препаратом Нуклеїнат у хворих на пієлонефрит з рецидивуючим перебігом достовірно знижує вміст фактора некрозу пухлин-альфа і моноцитарного хемоатрактантного протеїну-1 у крові та покращує функціональний стан каналцевого нефротелію за даними визначення ензимологічних показників з реноспецифічними властивостями.

Наводимо приклади застосування запропонованого способу.

Приклад 1. Хвора Г., 36 років, тематична карта № 300. Звернулася зі скаргами на тривалу субфебрильну температуру тіла, відчуття болю, печії та дискомфорту під час сечовипускання,

слабкість та часте рецидивування перелічених симптомів. Хворіє впродовж 15 років з частим рецидивуванням захворювання до 12 разів на рік (щомісяця), неодноразово проходила курси антибактеріального лікування, які не приносили бажаного ефекту. Діагноз: хронічний неускладнений пієлонефрит, рецидивуючий перебіг. Хворій було призначено Нуклеїнат за запропонованим способом на фоні антибактеріальної терапії (ципрофлоксацин 500 мг двічі на добу). Під час контрольного обстеження та через рік (планове обстеження) встановлено повну еррадикацію збудника. Продemonстровано зниження спонтанної продукції фактора некрозу пухлин-альфа (до лікування 74,4 пг/мл, після - 49,4 пг/мл) та моноцитарного хемоатрактантного протеїну-1 (до лікування 121 пг/мл, після - 76,9 пг/мл), а також нормалізацію рівнів активності реноспецифічної ферментурії (до лікування активність  $\beta$ -галактозидази сечі становить 15,35 мкмоль/год./ммоль креатиніну сечі, після лікування - 7,33 мкмоль/год./ммоль креатиніну сечі) та ферментемії (до лікування активність трансамідази сироватки крові - 0,54 ммоль/(год.·л), після лікування - 0, тобто не реєструється), що свідчить про достатню корекцію імунологічних та біохімічних порушень у цієї хворої. Рецидивів захворювання протягом року спостереження не констатовано.

Приклад 2. Хвора Б., 24 роки, тематична карта № 264. Звернулась зі скаргами на підвищення температури тіла до 37,8 °С, біль у кистово-вертебральному куті, дизурію. Хворіє протягом 7 років, коли почала статеве життя. Рецидиви захворювання відбуваються 6-8 разів протягом року. Діагноз: хронічний неускладнений пієлонефрит, рецидивуючий перебіг. Хворій була призначена антибактеріальна терапія: ципрофлоксацин 400 мг два рази на добу, парентерально до нормалізації температури тіла з наступним прийомом антибіотика перорально протягом 2 тижнів. Після лікування визначено повну еррадикацію збудника та усунення перелічених скарг. Проте рівень фактора некрозу пухлин-альфа у крові до лікування становив 54,2 пг/мл, після - 94,1 пг/мл, вміст моноцитарного хемоатрактантного протеїну-1 до лікування - 140,8 пг/мл, після - 98,1 пг/мл. Ензимологічні показники після лікування так і не досягли їх фізіологічних рівнів: активність  $\beta$ -галактозидази сечі до лікування становить 0,95 мкмоль/год./ммоль креатиніну сечі, після лікування - 3,83 мкмоль/год./ммоль креатиніну сечі, тобто нижньої межі нормальних коливань ферменту так і не було досягнуто, активність трансамідази сироватки крові до лікування становить 0,37 ммоль/(год.·л), після лікування - 0,14 ммоль/(год.·л), тобто продовжує реєструватися, що на загал свідчить про недостатню корекцію імунологічних та біохімічних порушень у цієї хворої. Протягом року спостереження констатовано 2 рецидиви.

Таким чином, використання запропонованого способу дозволить підвищити ефективність лікування хворих на пієлонефрит з рецидивуючим перебігом шляхом доповнення традиційної антибактеріальної терапії препаратом Нуклеїнат та достатній корекції імунологічних та біохімічних порушень у цих хворих, що сприяє стимуляції фагоцитарної ланки імунітету, зниженню рівнів прозапальних цитокінів крові у бік їх нормалізації та більш ефективній еррадикації збудників запалення, а також позитивним змінам реноспецифічної ферментурії та ферментемії, наслідком чого є гальмування процесів прогресування хвороби та запобігання її рецидивування.

#### Джерела інформації:

1. Использование иммуновита как иммуномодулятора в комплексной терапии вторичного пиелонефрита / Казько Н.И., Жмуров В.А., Добровольская М.Д. и соавт. // [www.tma.tmn.ru/urology/vestnikystatya](http://www.tma.tmn.ru/urology/vestnikystatya).

2. Пат. № 22359, UA, МПК (2006) A61K 36/00, A61P 13/10. Спосіб лікування хворих на хронічний пієлонефрит /Степанова Н.М., Дріянська В.С., Король Л.В., Руденко А.В., Калініна Н.А. Сидоренко Є.В.; ІНАМНУ; № у 200611240, 25.10.2006; Опуб. 25.04.2007, Бюл. № 5.-3 с. (найближчий аналог).

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

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб корекції імунологічних та біохімічних порушень у хворих на хронічний пієлонефрит з рецидивуючим перебігом, що включає традиційну антибактеріальну терапію, доповнену застосуванням препарату імуномодуючої дії, який **відрізняється** тим, що як імуномодуючий лікарський засіб внутрішньо застосовують Нуклеїнат у дозі 0,25 г 4 рази на добу протягом 14 днів та при зниженні у крові рівнів фактора некрозу пухлин- $\alpha$  та моноцитарного хемоатрактантного протеїну-1 більше ніж на 30 % та більше від вихідних даних, а також при визначенні активності  $\beta$ -галактозидази сечі у межах від 4,5 до 14,6

мкмоль/год./ммоль креатиніну і відсутності реєстрації активності трансамідази сироватки крові ефект корекції імунологічних та біохімічних порушень вважають досягнутим.

---

Комп'ютерна верстка М. Мацело

---

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