



УКРАЇНА

(19) UA (11) 53081 (13) U
(51) МПК
G01N 33/493 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ ЕФЕКТИВНОСТІ ВПЛИВУ ІМУНОТРОПНОЇ ТЕРАПІЇ НА ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН КАНАЛЬЦЕВОГО НЕФРОТЕЛІУ У ДІТЕЙ, ХВОРИХ НА ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТ З НЕФРОТИЧНИМ СИНДРОМОМ

1

2

(21) u201002753

(22) 11.03.2010

(24) 27.09.2010

(46) 27.09.2010, Бюл.№ 18, 2010 р.

(72) ФОМІНА СВІТЛАНА ПЕТРІВНА, БАГДАСАРОВА ІНГРЕТА ВАРТАНІВНА, МИГАЛЬ ЛЮДМИЛА ЯКИМІВНА, КОРОЛЬ ЛЕСЯ ВІКТОРІВНА, ПОПОВА ЛЮДМИЛА ВАСИЛІВНА

(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ НЕФРОЛОГІЇ АМН УКРАЇНИ"

(57) Спосіб оцінки ефективності впливу імунотропної терапії на функціональний стан каналцевого нефротелію у дітей, хворих на гломерулонефрит з нефротичним синдромом, що включає визначення у сечі дітей активності лізосомного каналцевого

ферменту β -галактозидази, який відрізняється тим, що активність лізосомного каналцевого ферменту β -галактозидази визначають колориметричним методом у сечі дітей після завершення курсу лікування, і, якщо величини активності цього ферменту дорівнюють його фізіологічним рівням від 4,5 до 14,6 мкмоль/год/ммоль креатиніну (при середньому значенні $9,6 \pm 0,7$ мкмоль/год/ммоль креатиніну) або незначно перевищують верхню межу його фізіологічних коливань, вплив імунотропної терапії на функціональний стан каналцевого нефротелію оцінюють як добрий, якщо величини активності цього ферменту перевищують його середнє значення у 3-4 рази - задовільний, а у 7-8 та більше разів - незадовільний.

Спосіб відноситься до медицини, а саме до дитячої нефрології і може бути використаний для оцінки ефективності впливу імунотропної терапії на функціональний стан каналцевого нефротелію у дітей, хворих на гломерулонефрит з нефротичним синдромом, та оптимізації на цій підставі схем їх раціонального лікування.

Нефротичний синдром у дітей, хворих на первинний гломерулонефрит, - рідкий, але тяжкий варіант гломерулопатії. Необхідність довготривалого наполегливого лікування, тенденція до хронізації патологічного процесу в нирках та можливість розвитку хронічної ниркової недостатності визначають актуальність даної проблеми. Для оптимізації лікування цього захворювання та зниження частоти його рецидивів необхідно мати об'єктивні критерії оцінки ефективності впливу застосованої терапії у дітей, хворих на гломерулонефрит з нефротичним синдромом, на функціональний стан каналцевого апарату нефрону, бо саме від прогресування патологічних змін у цьому відділі нирки з подальшим втягненням у патологічний процес тубулоінтерстиціальної тканини головним чином залежить розвиток нефросклеротичних змін та прогресування хвороби.

Відомий спосіб діагностики ішемії паренхіми нирки (1), що включає визначення активності лізосомного каналцевого ферменту β -галактозидази колориметричним методом в корковому шарі нирок в умовах експериментальної індукції хронічного ішемічного процесу в паренхімі нирки. Спосіб є інформативним щодо втягнення епітелію каналцевого відділу нефрону у патологічний процес, тому що ферменти лізосом розташовані переважно вздовж звивистих каналців та об'єктивно відбивають їх функціональний стан.

Недоліком способу є його травматичність та неможливість застосування у дітей, хворих на гломерулонефрит з нефротичним синдромом, у зв'язку з тим, що цей спосіб виконують в умовах експериментальної моделі на тваринах.

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб діагностики пошкодження епітелію проксимальних каналців нирок у дітей, хворих на гломерулонефрит (2), взятий нами за прототип, що включає визначення активності лізосомного каналцевого ферменту (β -галактозидази в сечі дітей.

Недоліком способу є те, що активність ферментів визначають флюориметричним методом до початку застосування лікувальних засобів, тобто

(19) UA (11) 53081 (13) U

не проводять співставлень між результатами терапії та рівнем активності ферменту, що нівелює доцільність його застосування.

В основу корисної моделі поставлена задача удосконалити спосіб оцінки ефективності впливу імунотропної терапії на функціональний стан канальцевого нефротелію у дітей, хворих на гломерулонефрит з нефротичним синдромом, шляхом визначення колориметричним методом у сечі дітей після завершення курсу імунотропного лікування рівнів активності лізосомного канальцевого ферменту β -галактозидази, що дасть можливість залежно від кількісних величин показників ферментурії своєчасно дати оцінку ефективності імунотропної терапії щодо впливу її на патологічний процес в канальцевому апараті нирок та використувувати одержані дані для подальшої оптимізації лікувальної тактики ведення таких хворих, зниження частоти рецидивів та уповільнення прогресування захворювання.

Важливим є те, що визначення у сечі хворих дітей активності ферменту, що на органному рівні переважно має локалізацію в нирках, на клітинному - у звивистих канальцях проксимального відділу нефрону, на субклітинному - в лізосомах (розчинений в матриці цієї органели) та має на цій підставі певні органоспецифічні щодо нирок властивості, забезпечує більш точну, надійну та об'єктивну, тобто більш інформативну, оцінку змін функціонального стану нефротелію тубулярного відділу нефрону під впливом застосованого імунотропного лікування патологічного процесу в нирках.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб оцінки ефективності впливу імунотропної терапії на функціональний стан канальцевого нефротелію у дітей, хворих на гломерулонефрит з нефротичним синдромом, що включає визначення у сечі дітей активності лізосомного канальцевого ферменту β -галактозидази, згідно з винаходом, активність лізосомного канальцевого ферменту β -галактозидази визначають колориметричним методом у сечі дітей після завершення курсу лікування, і, якщо величини активності цього ферменту дорівнюють його фізіологічним рівням від 4,5 до 14,6 мкмоль/год/ммоль креатиніну (при середньому значенні $9,6 \pm 0,7$ мкмоль/год/ммоль креатиніну) або незначно перевищують верхню межу його фізіологічних коливань, вплив імунотропної терапії на функціональний стан канальцевого нефротелію оцінюють як добрий, якщо величини активності цього ферменту перевищують його середнє значення у 3-4 рази - задовільний, а у 7-8 та більше разів - незадовільний.

Спосіб оцінки ефективності впливу імунотропної терапії на функціональний стан канальцевого нефротелію у дітей, хворих на гломерулонефрит з нефротичним синдромом, виконують наступним чином: в сечі дітей після завершення курсу лікування визначають активність ферменту β -галактозидази - в пробірку беруть 0,2 мл профільтрованої сечі і додають до них 0,3 мл 0,1 М цитратного буферу рН 4,0 та 0,2 мл субстрату, який включає 5,0 мМ розчин 2-нітрофеніл-Р-0-галактопіранозиду у 0,1 М цитратному буфері рН 4,0, проби інкубують 30 хвилин при 37 °С, ферме-

нтативну 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 β -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 пікриновою кислотою.

Апробація способу, що заявляється, проведена у відділі дитячої нефрології та у лабораторії біохімії ДУ "Інститут нефрології АМН України" у 83 дітей, переважали хлопчики, віком від 2 до 17 років з верифікованим діагнозом - гломерулонефрит з нефротичним синдромом та у 25 практично здорових дітей того ж віку з нормальними аналізами сечі та без захворювань нирок в анамнезі (група контролю).

Діти, хворі на гломерулонефрит з нефротичним синдромом, отримують патогенетичну імунотропну терапію, що включає терапію глюкокортикоїдами, яку при документованій частковій або повній гормонорезистентності доповнюють цитостатиками. Дітей, хворих на гломерулонефрит з нефротичним синдромом, залежно від ефективності терапії поділено на групи: "а" - 50 хворих, у яких за результатами лікування діагностовано повну клініко-лабораторну ремісію (відсутність набряків, нормалізація біохімічних показників та аналізів сечі), "б" - 12 хворих, у яких діагностовано часткову клініко-лабораторну ремісію (відсутність набряків, нормалізація або значне покращання біохімічних показників, протеїнурія менше 0,5-1,0 г/добу), "в" - 21 хворий, у яких ефект від лікування був відсутнім (відсутність позитивної динаміки клініко-лабораторних показників, торпідний перебіг хвороби).

Отримані результати показали, що у сечі здорових дітей активність β -галактозидази з урахуванням середньої арифметичної величини та її похибки ($M \pm m$) 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 - $M \pm 1,5 \sigma$ (4), величини, що характеризує ступінь варіювання будь-якого показника, становить від 4,5 до 14,6 мкмоль/год/ммоль креатиніну. Тобто, якщо активність β -галактозидази сечі реєструється у інтервалі від 4,5 до 14,6 мкмоль/год/ммоль креатиніну, то чисельні рівні її активності відповідають фізіологічним, тобто контрольним, значенням.

Результати визначення активності лізосомного канальцевого ферменту β -галактозидази у сечі дітей, хворих на гломерулонефрит з нефротичним синдромом, після завершення курсу програмного лікування з урахуванням ефективності лікування (досягнення в результаті терапії повної клініко-лабораторної ремісії або часткової клініко-лабораторної ремісії, а також у випадках лікування без суттєвого ефекту) наведені в таблиці.

Таблиця

Активність β -галактозидази у сечі дітей, хворих на гломерулонефрит з нефротичним синдромом, після завершення курсу терапії залежно від її ефективності: повна клініко-лабораторна ремісія, часткова клініко-лабораторна ремісія, без ефекту ($M \pm m$)

Групи обстежених дітей з	Активність β -галактозидази (мкмоль/год/ммоль креатиніну)	Статистичний показник
а - повною клініко-лабораторною ремісією (n=50)	15,45 \pm 1,35	$P_{a-b} < 0,001$ $P_{a-b} < 0,001$
б - частковою клініко-лабораторною ремісією (n=12)	35,50 \pm 3,43	$P_{a-k} < 0,001$ $P_{b-b} < P_{0,001}$ $P_{b-k} < 0,001$
в - без ефекту (n=21)	77,90 \pm 6,31	$P_{v-k} < 0,001$
к - практично здорові діти межі фізіологічних коливань (n=25)	9,58 \pm 0,68 (4,5-14,6)	

Як свідчать представлені в таблиці дані, рівні активності β -галактозидази у сечі дітей, хворих на гломерулонефрит з нефротичним синдромом, після завершення курсу лікування, вірогідно перевищують аналогічний показник у дітей з контрольної групи.

Що стосується групи "а", у якій після завершення курсу імунотропної терапії досягнуто повної клініко-лабораторної ремісії, то, хоча середні дані активності β -галактозидази вірогідно і перевищують аналогічний показник контролю (15,45 \pm 1,35 проти 9,58 \pm 0,68 мкмоль/год/ммоль креатиніну, $P_{a-k} < 0,001$), результати індивідуального аналізу рівнів її активності показують, що саме у цій групі хворих активність ферменту у 72 % пацієнтів знаходиться у межах його фізіологічних (контрольних) коливань, тобто від 4,5 до 14,6 мкмоль/год/ммоль креатиніну, а у решти хворих - незначно перевищувала верхню межу його контрольних коливань (таблиця). Порівняльний аналіз між групами після припинення курсу лікування, засвідчив, що за середніми даними рівні активності β -галактозидази у групі "б"- з частковою клініко-лабораторною ремісією, статистично вірогідно перевищували аналогічні показники у групі "а"- з повною клініко-лабораторною ремісією, а рівні активності β -галактозидази у групі "в"- без ефекту, за середніми даними статистично вірогідно перевищували активність цього ферменту у групах "а" та "б".

Індивідуальний аналіз отриманих результатів визначення активності β -галактозидази у сечі дітей, хворих на гломерулонефрит з нефротичним синдромом, після завершення курсу лікування окремо у кожній із груп показав, що у групі "а" рівні цього ферменту або дорівнюють його фізіологічним рівням, або незначно перевищують верхню межу його фізіологічних коливань, тобто у даному випадку вплив імунотропної терапії оцінюють як добрий, у групі "б" зареєстровано збільшення рівнів активності цього ферменту вище за контрольні значення у 3-4 рази і вплив імунотропної терапії оцінюють як задовільний, а у групі "в" зареєстровано збільшення активності цього ферменту вище за контрольні значення у 7-8 та більше разів і

вплив імунотропної терапії оцінюють як незадовільний.

Таким чином, проведений аналіз особливостей індивідуальних змін рівнів активності β -галактозидази у сечі дітей, хворих на гломерулонефрит з нефротичним синдромом, залежно від результатів програмного лікування імунотропними препаратами підтвердив правильність вибраного підходу до вибору ферменту у відношенні інформативності та об'єктивності оцінки ефективності впливу імунотропної терапії на функціональний стан каналцевого нефротелію у цих пацієнтів.

Точність способу: похибка у двох паралельних визначеннях активності β -галактозидази у сечі не перебільшує $\pm 3,3$ %.

Наводимо приклади практичного застосування запропонованого способу.

Приклад 1. Хворий Роман Ч., 4,5 роки, і. х. № 98 (16.02-3.03.2005). Клінічний діагноз: гломерулонефрит, нефротична форма, частковогормонорезистентний варіант. Хворіє з 03.2004 р. Останнє заострення в 07.2004 р., отримав імунотропне лікування за протоколом в максимальних дозах (преднізолон, циклоспорин А, лейкеран), госпіталізований на підтримуючій терапії для уточнення тактики ведення. Скарги відсутні. Загальний стан не порушено. АТ 80/40 мм рт. ст. При стандартному лабораторному та інструментальному обстеженні патології не виявлено (аналіз крові: гемоглобін 106 г/л, еритроцити $3,5 \times 10^{12}$ /л, к. п. 0,9, лейкоцити $4,4 \times 10^9$ /л, ШЗЕ 2 мм/год; сечовина 7,8 ммоль/л, креатинін 0,088 ммоль/л, глюкоза 4,6 ммоль/л, холестерин 4,1 ммоль/л, загальний білок 70,0 г/л, альбуміни 59 %, альбуміни/глобуліни 1,45, α_1 -глобуліни 3,6 %, α_2 -глобуліни 10,5 %, β -глобуліни 10,5 %, γ -глобуліни 14,6 %; швидкість клубочкової фільтрації 107 мл/хв.; в сечі добова протеїнурія не виявлена, питома вага до 1,027, сечовий осад - без особливостей; УЗД нирок та черевної порожнини - вікова норма). Документована стадія повної клініко-лабораторної ремісії без порушення функції нирок, терапію преднізолоном і лейкераном відмінено. При застосуванні способу, що заявляється, виявлено, що активність β -

галактозидази сечі становила 13,51 мкмоль/год/ммоль креатиніну (20.02.2005), тобто цей показник реєструвався у межах його фізіологічних або контрольних коливань (див. таблицю), що свідчить про добрий вплив лікування, що було застосоване, на функціональний стан каналцевого нефротелію у даного пацієнта.

Приклад 2. Хвора Єлизавета В., 4 роки, і.х. № 210 (2-24.04.2007). Клінічний діагноз: гломеруло-нефрит, нефротична форма, гормонорезистентний варіант. Хворіє з 05.2006 р. Останнє загострення в 11.2006 р., отримала імунотропне лікування за протоколом в максимальних дозах (преднізолон, циклофосфан, гепарин), госпіталізована для уточнення тактики ведення. Скарги відсутні. Загальний стан не порушено. АТ 90/60 мм рт. ст. При стандартному лабораторному та інструментальному обстеженні виявлено зміни в протеїнограмі, гіперхолестеринемію та нестійкий сечовий синдром (аналіз крові: гемоглобін 109 г/л, еритроцити $3,8 \times 10^{12}/л$, к. п. 0,86, лейкоцити $4,9 \times 10^9/л$, ШЗЕ 29 мм/год; сечовина 2,7 ммоль/л, креатинін 0,04 ммоль/л, глюкоза 4,0 ммоль/л, холестерин 7,74 ммоль/л, загальний білок 59,0 г/л, альбуміни 54 %, альбуміни/глобуліни 1,18, α_1 -глобуліни 6,5 %, α_2 -глобуліни 19,9 %, β -глобуліни 13,9 %, γ - глобуліни 5,7 %; швидкість клубочкової фільтрації 134 мл/хв.; в сечі добова протеїнурія від 0,4 до 3,0 г, питома вага до 1,020, сечовий осад - без особливостей; УЗД нирок та черевної порожнини - вікова норма). Документована стадія часткової клініко-лабораторної ремісії без порушення функції нирок, продовжено терапію преднізолоном та селективними імунодепресантами. Застосування способу, що заявляється, при контрольному обстеженні виявило, що активність β -галактозидази сечі становила 30,32 мкмоль/год/ммоль креатиніну (17.04.2007), тобто величина активності цього ферменту перевищувала його середнє контрольне значення (див. таблицю) у 3,2 раза, що свідчить про задовільний вплив лікування на функціональний стан каналцевого нефротелію у даної пацієнтки.

Приклад 3. Хвора Інна Л., 4,5 роки, і. х. № 349 (31.05-7.06.2007). Клінічний діагноз: гломеруло-нефрит, нефротичний синдром з еритроцитурією, гормонорезистентний варіант. Хворіє з 09.2006 р, отримала імунотропне лікування за протоколом в максимальних дозах (преднізолон, мікофенолата мофетил), госпіталізована для уточнення тактики ведення. Скарги відсутні. Загальний стан не порушено. АТ 80/50 мм рт. ст. При стандартному лабораторному та інструментальному обстеженні виявлено зміни в протеїнограмі, гіперхолестеринемію, протеїнурію нефротичного рівня та тубуло-інтерстиціальний компонент (аналіз крові: гемоглобін 102 г/л, еритроцити $2,8 \times 10^{12}/л$, к. п. 0,89, лейкоцити $4,4 \times 10^9/л$, ШЗЕ 39 мм/год.; сечовина 5,4 ммоль/л, креатинін 0,036 ммоль/л, глюкоза 3,8 ммоль/л, холестерин 7,7 ммоль/л, загальний білок 55,0 г/л, альбуміни 49 %, альбуміни/глобуліни 0,96, α_1 -глобуліни 5,2 %, α_2 -глобуліни 23,0 %, β -глобуліни 16,3 %, γ - глобуліни 6,6 %; швидкість клубочкової фільтрації 94 мл/хв.; в сечі добова протеїнурія від 0,8 до 3,9 г, питома вага до 1,020, мікролейкоцитурія до 8000 кл/мл

лімфоцитарного характеру; УЗД черевної порожнини - вікова норма, нирок - підвищена ехогенність паренхіми). Документована стадія часткової клініко-лабораторної ремісії без порушення функції нирок, продовжено терапію преднізолоном та селективними імунодепресантами. Застосування запропонованого способу при контрольному обстеженні виявило, що активність β -галактозидази сечі становила 84,3 мкмоль/год/ммоль креатиніну (05.06.2007), тобто величина активності цього ферменту перевищувала його середнє контрольне значення (див. таблицю) у 8,8 раза, що свідчить, незважаючи на документовану тенденцію до зниження протеїнурії та нормалізацію біохімічних показників, про незадовільний вплив лікування на функціональний стан каналцевого нефротелію у цієї хворої. В подальшому захворювання прогресувало без клінічного погіршення і через 9 місяців у дитини було документовано розвиток хронічної ниркової недостатності.

З наведених прикладів видно, що у всіх трьох хворих за допомогою тільки клініко-лабораторних показників, які характеризують загальну відповідь організму на патологічний чинник, дати об'єктивну оцінку ефективності впливу терапевтичних імунотропних засобів, що застосовують, на функціональний стан паренхіми нирок, зокрема функціональний стан каналцевого нефротелію, не уявляється можливим. Тільки застосування запропонованого способу дозволить вірогідно оцінити у кожної хворої дитини ефективність впливу отриманого імунотропного лікування безпосередньо на функціональний стан паренхіми нирок (тубулярного епітелію) і таким чином оцінити ефективність його впливу на патологічний чинник саме в нирках, тобто своєчасно та об'єктивно дати оцінку ефективності застосованої імунотропної терапії, що необхідно враховувати поряд з іншими клініко-лабораторними показниками для корекції подальших схем терапевтичних заходів.

Найбільш вагомою перевагою запропонованого способу є визначення у сечі дітей, хворих на гломеруло-нефрит з нефротичним синдромом, активності ферменту β -галактозидази після завершення курсу програмного лікування та розподіл пацієнтів з урахуванням ефективності терапевтичних заходів, а також встановлення меж розподілу між здоровими та хворими дітьми з використанням величин середнього арифметичного ряду та середнього квадратичного відхилення та використання на підставі цього індивідуального підходу до кожного пацієнта щодо об'єктивної оцінки його ферментуричного статусу (насамперед стосується хворих, у яких в результаті лікування було досягнуто повної клініко-лабораторної ремісії). Крім того, до переваг способу відноситься також використання неабсолютних показників (кратності підвищення середнього показника контролю), що дозволяє усунути залежність кінцевого результату від методу та умов визначення ферменту, одиниць виміру тощо, його спрощеність (вимірюють всього один показник) та доступність устаткування - фотоелектроколориметр, що в цілому дозволяє більш об'єктивно оцінювати вплив імунотропної терапії на функціональний стан каналцевого не-

фротелію у дітей, хворих на гломерулонефрит з нефротичним синдромом.

Таким чином, спосіб оцінки ефективності впливу імунотропної терапії на функціональний стан канальцевого нефротелію у дітей, хворих на гломерулонефрит з нефротичним синдромом, є точним, неінвазивним, безпечним та нескладним у виконанні, добре відтворюваним та діагностично високоінформативним: діагностична ефективність способу дорівнює 100 %.

Джерела інформації:

1. Пирогов В. О. Спосіб діагностики ішемії паренхіми нирки /В.О.Пирогов, Л.Я.Мигаль, Г.Г.Нікуліна, С.В.Нікітаєв //Патент на корисну модель № 36540, Україна, МПК(2006) G01N 33/48; № u200807888, 10.06.2008; Опубл. 27.10.2008. Бюл.- № 20.-3 с.

2. Дивеева А. С. Способ диагностики повреждения эпителия проксимальных канальцев почек у детей при гломерулонефрите / А. С. Дивеева, Д. И. Ишкабулов, Н. А. Каримова // Патент № 2075083 С1, РФ. 6 G01N 33/68. № 92005076, 10.11.92. Опубл. 10.03.97. Бюл- 8- 5 с. (прототип).