



УКРАЇНА

(19) UA (11) 18785 (13) U
(51) МПК (2006)
A61B 10/02
G01N 33/48МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ БІОХІМІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ ТУБУЛО-ІНТЕРСТИЦІЙНОГО КОМПОНЕНТА

1

(21) u200606156
(22) 02.06.2006
(24) 15.11.2006
(46) 15.11.2006, Бюл. № 11, 2006 р.
(72) Пішак Василь Павлович, Дікал Мар'яна Вікторівна, Висоцька Віолетта Георгіївна, Магляр Віктор Миколайович, Ломакіна Юлія Вячеславівна
(73) Магляр Віктор Миколайович

Корисна модель відноситься до галузі медицини, а саме до нефрології і може бути використана в клініці і в експериментальних дослідженнях для діагностики тубуло-інтерстиційного компонента (ТІК) як основи швидкого прогресування хронізації патології нирок.

В клініці та при експериментальних дослідженнях на тваринах хронічного патологічного процесу в нирках необхідна своєчасна діагностика тубуло-інтерстиційного компонента, тому що ТІК призводить до швидкого прогресування патології нирок в напрямку хронічної ниркової недостатності (ХНН), є основою гострих ускладнень хронічного патологічного процесу в нирках.

Відомий спосіб діагностики ТІК шляхом пункційної біопсії нирки хворого, з послідуочим гістологічним дослідженням біоптату. Діагноз ТІК виставляється в тому випадку, коли в гістологічному зрізі нирки вдається встановити пошкодження ниркових канальців (гідропічна, зерниста, гіаліново-капельна дистрофія та ін.), а також наявність патології інтерстиція (набряк, інфільтрація клітинними елементами, розростання сполучної тканини [Ратнер М.Я., Серов В.В., Варшавський В.А., Зубкин М.А., Балакирев И.М., Стенина И.И. Клинические и морфологические предикторы прогрессирования хронического гломерулонефрита // Тер. Архив. - 1989. - т.61, №6. - С.14-19.].

Проте вказаний спосіб має цілий ряд недоліків. Пошкодження ниркових канальців із-за відсутності чітких кількісних критеріїв їх пошкодження. Оцінка міри розростання сполучної тканини також оцінюється чисто якісно, що зменшує точність діа-

2

(57) Спосіб біохімічної діагностики тубуло-інтерстиційного компонента, що включає дослідження біопсійного матеріалу, який відрізняється тим, що наявність тубуло-інтерстиційного компонента встановлюють за вірогідним зростанням вмісту оксипроліну як маркера розростання колагену і зниженню активності сукцинатдегідрогенази в кірковій речовині нирок як кількісного критерію пошкодження ниркових канальців.

гностики пошкодження інтерстицію нирок. В цілому, точність діагностики відомого прототипу складає - 55-60%.

Метою запропонованої корисної моделі є спосіб діагностики ТІК з розширенням функціональних можливостей методу за рахунок підвищення точності діагностики як пошкодження ниркових канальців так і патології інтерстиція.

Поставлена мета досягається тим, що діагностика пошкодження ниркових канальців оцінюється кількісно біохімічним визначенням активності ключового ферменту циклу Кребса - сукцинатдегідрогенази (СДГ) [КФ 1.3.99.1], який в нормі виявляє високу активність в канальцях нефрону кіркової речовини нирок і є дуже чутливим до пошкодження [Гоженко А.И. Энергетические обеспечение основных почечных и процессов в норме и при повреждении почек: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. - Киев, 1987. - 38с]. А оцінка міри розростання сполучної тканини в інтерстиції оцінюється по кількісному визначенню оксипроліну, як маркера колагену [Шараев П.Н., Ботникова Е.А., Зубарев О.Н., Малинин О.В., Зубкова СВ. Определение свободного и связанного оксипролина в моче // Лаб. дело. - 1990. - №12. - С.23-25.].

Діагноз ТІК виставляється на основі вірогідності зниження активності сукцинатдегідрогенази (СДГ) в кірковій речовині нирок і достеменному зростанні концентрації оксипроліну в даній зоні нирки в порівнянні з контролем.

При експериментальних дослідженнях визначення активності сукцинатдегідрогенази і коцентрації оксипроліну проводять в кірковій речовині

(19) UA (11) 18785 (13) U

нирки експериментальних тварин (білі щури і ін.). В клініці використовують біопсійний матеріал кіркової речовини нирки хворого.

Активність сукцинатдегідрогенази визначають по методу [Гоженко А.И. Активность сукцинатдегидрогеназы и содержание пиридиннуклеотидов в корковом веществе почек при нефрите у крыс // IV Всесоюзная конференция по водно-солевому обмену и функции почек. - Черновцы, 1974. - С.50-51.], 0,25мл 0,2М сукцинату натрію +0,5мл 0,2% 2,3,5 - трифенілтертазолію хлористого + 0,65мл 0,5М Тріс - НС1 буферу (рН-7,4)+0,1мл 10% гомогенату. Інкують в термостаті при 37°C на протязі 30хв.

Реакцію зупиняють шляхом добавлення 5мл бутанолу. Центрифугують 10хв при 300об/хв. Вимірюють оптичну густину бутанольних екстрактів на КФК-2 в 1см кюветі при довжині хвилі 490нм проти контролю, в якому замість 0,1мл гомогенату дистильована вода.

Активність ферменту розраховують в мкг/мг білки/годину. Калібрувальний графік будують по 2,3,5 - трифенілтетразолію хлористому, для перетворення якого в формазан використовують Na₂S. Білок визначають по методу [Lowy O.I., Rosebraugh N.I., Parr A.L., Raundueall R.I., Protein measurment with Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. - 1951. - V.193, №1. - P.265-275].

Оксипролін в кірковій речовині нирок визнача-

ють по методу [Stegemaun H. Mikrobsteinemung von Hydroxyprolin mit chloramin-T und p-Dimethylaminobensaldehyd // Hoppe - sayler'sz. physiol. chem. - 1958. - Bd.311, №1-3. - S.41-45] 10-20мг сухої обезжиреної тканини (екстракція ліпідів в хлороформ-метанольній суміші - 2:1 на протязі 24 годин з послідуною фільтрацією і висушуванням на обеззолених фільтрах) гідролізують при 100°C в скляних високих пробірках з пришліфованими пробками на протязі 12 годин в 2мл суміші НСІ - мурашина кислоти (5:1) 0,2мл гідролізату нейтралізують до 1мл 6N NaOH. Додають 0,5мл реактиву для окислення (2,8г хлораміну+40мл дистильованого буферу, рН-6,0).

Встрякують 5хв, після чого додають 1мл 4М хлорної кислоти і 0,5мл 10% розчину диметиламіноазобензальдегіду в метанолі. Інкують 15хв при 60°C. Вимірюють оптичну густину розчину після охолодження в 1см кюветі на СФ-46 при довжині хвилі 558нм проти контролю, в якому замість гідролізату - 1мл дисцильованої води. Концентрацію оксипроліну виражають в мкг/г сухої тканини. Калібрувальний графік будують по чистому оксипроліну. Використання методу в експерименті в момент формування ТІК на 30 день сулемової нефропатії показано вірогідне зростання оксипроліну і достеменно зниження активності сукцинатдегідрогенази (таблиця 1).

Таблиця 1

Активність сукцинатдегідрогенази і концентрація оксипроліну в кірковій речовині нирок на 30 день сулемової нефропатії (x±Sx)

Показники, що досліджуються	Контроль (n=6)	Сулемова нефропатія 30 день (n=6)
Оксипролін мкг/г сухої тканини	2,66±0,15	5,11±0,09 p<0,001
Активність сукцинатдегідрогенази мкг/мг білка/годину	33,55±2,72	1,89±0,71 p<0,001

p - достовірність різниць в порівнянні з контролем,
n - число спостережень.

Відповідність критерію "новизна" даному способу забезпечує те, що вперше для діагностики ТІК використані кількісні біохімічні критерії патології ниркових каналців та інтерстицію.

Той факт, що оцінка пошкодження ниркових каналців проводиться на основі визначення активності ключового ферменту циклу Кребса сукцинатдегідрогенази (СДГ), який в нормі виявляє високу

активність в ниркових каналцях кіркової речовини і є дуже чутливим до пошкодження, а оцінка міри розростання сполучної тканини проводиться по біохімічному каркасу колагену - оксипроліну забезпечує вказаному способу відповідність критерію "суттєві відмінності".

Вказаний метод забезпечує підвищення точності діагностики (таблиці 2).

Таблиця 2

Порівняльна характеристика точності діагностики ТІК у хворих з хронічним гломерулонефритом

Метод діагностики	Кількість хворих з хронічним гломерулонефритом	Діагностовано ТІК	Точність діагностики, %
Гістологічний метод	20	12	60
Запропонований метод	20	20	100

Таким чином, застосування даного способу у хворих з хронічним гломерулонефритом (ХГ) за-

безпечує підвищення точності діагностики з 60% при використанні гістологічного методу до 100%

при використанні вказаним способом. Це забезпечує відповідність даного корисної моделі критерію "позитивний ефект".

Джерела літератури

1. Ратнер М.Я., Серов В.В., Варшавський В.А., Зубкин М.А., Балакирев И.М., Стенина И.И. Клинические и морфологические предикторы прогрессирования хронического гломерулонефрита // Тер. Архив. - 1989. - т.61, №6. - С.14-19.

2. Гоженко А.И. Энергетическое обеспечение основных почечных и процессов в норме и при повреждении почек: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. - Киев, 1987. - 38с.

3. Шараев П.Н., Ботникова Е.А., Зубарев О.Н., Малинин О.В., Зубкова СВ. Определение свобод-

ного и связанного оксипролина в моче // Лаб. дело. - 1990. - №12. - С.23-25.

4. Гоженко А.И. Активность сукцинатдегидрогеназы и содержание пиридиннуклеотидов в корковом веществе почек при нефрите у крыс // IV Всесоюзная конференция по водно-солевому обмену и функции почек. -Черновцы, 1974. - С.50-51.

5. Lowry O.I., Rosebraugh N.I., Farr A.L., Raundueall R.I., Protein measurment with Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. - 1951. - V.193, №1. - P.265-275.

6. Stegemaun H. Mikrobestinung von Hydroxyprolin mit chloramin-T und p- Dimethylaminobensaldehyd // Hoppe - sayler'sz. physiol. chem. - 1958. - Bd.311, №1 - 3.-S.41-45.