



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **93731** (13) **U**
(51) МПК
G01N 33/493 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2014 05297</p> <p>(22) Дата подання заявки: 19.05.2014</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.10.2014</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.10.2014, Бюл.№ 19</p>	<p>(72) Винахідник(и): Лобода Андрій Миколайович (UA), Маркевич Віталій Едуардович (UA), Петрашенко Вікторія Олександрівна (UA)</p> <p>(73) Власник(и): СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Римського-Корсакова, 2, м. Суми, 40007 (UA)</p>
--	--

(54) СПОСІБ НЕІНВАЗИВНОЇ ДІАГНОСТИКИ ПОРУШЕННЯ ФУНКЦІЇ НИРОК У НОВОНАРОДЖЕНИХ ІЗ АСФІКСІЄЮ

(57) Реферат:

Спосіб неінвазивної діагностики порушення функції нирок у новонароджених із асфіксією шляхом визначення рівня інтерлейкіну-18 у сечі немовлят включає визначення рівня інтерлейкіну-18 у сечі немовлят, що здійснюють на 1-2 добу життя немовляти імуноферментним методом на автоматичному аналізаторі, при цьому, якщо рівень ІЛ-18 складає від 12,89 до 16,23 пг/мл, діагностують ураження нирок внаслідок помірної асфіксії, а при рівні ІЛ-18 від 25,29 до 35,81 пг/мл діагностують ураження нирок внаслідок тяжкої асфіксії.

UA 93731 U

Корисна модель належить до медицини, а саме до неонатології, перинатології, педіатрії, дитячої нефрології і може бути використана в клінічній практиці для діагностики порушення функції нирок у новонароджених, що мали асфіксію при народженні.

5 Частота виявлення асфіксії новонароджених, за даними різних авторів, коливається в межах 1-1,5% [1]. Одним з критеріїв, що враховується для встановлення діагнозу асфіксії (Американська асоціація педіатрії (AAP) та Американський коледж акушерства та гінекології (ACOG)), є наявність поліорганної дисфункції [2].

10 Падіння напруги кисню в крові нижче 40 мм рт. ст. включає так званий "ішемічний рефлекс", що викликає централізацію кровообігу та розвиток ішемії шкіри, легень, нирок, печінки, шлунково-кишкового тракту, заради забезпечення функції життєво важливих органів (серця, мозку, наднирників). При подальшій нестачі кисню порушується також і функція останніх [3]. Наявність гемореологічних та метаболічних порушень внаслідок асфіксії призводить до формування гіпоксично-ішемічної енцефалопатії, нефропатії, постгіпоксичної кардіопатії, анемії [3, 4].

15 Асфіксія супроводжується нирковим дистресом у 50% новонароджених. Ниркова дисфункція може виникати протягом першої доби життя на тлі гіпоксичного впливу внаслідок порушення метаболізму, гемодинаміки й мікроциркуляції [4]. Поширеність порушення функції нирок у новонароджених в критичному стані складає від 8 до 24%, при цьому смертність коливається від 10 до 61% [5].

20 Рання діагностика уражень нирок у новонароджених утруднена через відсутність специфічної клінічної симптоматики і недостатню інформативність традиційних методів обстеження [6].

У більшості випадків функція нирок оцінюється за кліренсом ендogenous креатиніну. Саме цей показник лежить в основі шкали pRIFLE (risk, injury, failure, loss, and end-stage renal disease), яка використовується для виявлення ураження нирок у новонароджених в критичному стані [7].

25 Відомо, що на сироватковий рівень креатиніну можуть впливати такі фактори, як стать, вік, маса тіла пацієнта, нутритивний статус. У новонароджених у першу добу життя на вміст креатиніну у сироватці крові значно впливає його показник у матері [8].

30 Пошук нових маркерів, вивчення їх чутливості і специфічності в клінічних дослідженнях продовжується і сьогодні. Ідеальний біомаркер ураження нирок має відповідати наступним вимогам: відзначатися високою органоспецифічністю, корелювати з гістологічними змінами при біопсії нирок, надавати можливість раннього виявлення ушкодження та його топіки, дослідження має бути неінвазивним, визначення має бути простим, швидким, дешевим, відтворюватися на широкому загалі пацієнтів [9].

35 Одним з найбільш перспективних біомаркерів ушкодження нирок є інтерлейкін-18 (ІЛ-18) сечі. Він синтезується епітелієм проксимальних ниркових канальців під впливом ішемії або нефротоксичних чинників. Його концентрація в сечі є максимальною при гострому ушкодженні нирок. Визначення його рівня в сечі дозволяє на ранній стадії визначити наявність ушкодження ниркової тканини та його топіки [10]. Важливою перевагою моніторингу концентрації ІЛ-18 в сечі є неінвазивність дослідження у новонароджених в критичному стані.

40 Отже, вищенаведені дані дозволяють вважати зазначений інтерлейкін раннім специфічним маркером ушкодження нирок у новонароджених із асфіксією.

45 Недоліком існуючих способів діагностики є те, що клінічне обстеження новонароджених, особливо у критичному стані, протягом перших годин життя не дозволяє виявити ураження нирок. Адекватний темп діурезу у новонароджених не завжди відображає нормальну функцію нирок (так звана неолігурична гостра ниркова недостатність). В той же час олігурія може бути проявом транзиторних особливостей функціонування нирок після народження навіть у здорових дітей.

50 Традиційні лабораторні показники недостатньо специфічні і чутливі для раннього виявлення гострого пошкодження нирок. Сироваткова концентрація креатиніну при гострому пошкодженні нирок збільшується дуже повільно, крім того відсутня лінійна кореляція між його вмістом та швидкістю клубочкової фільтрації (СКФ).

55 Сучасні інструментальні методи діагностики ураження нирок, такі як ультразвукове дослідження, доплерографія, комп'ютерна томографія тощо не дозволяють оцінити наявність ушкодження нирок на ранньому етапі.

Своєчасна діагностика ниркової патології необхідна для невідкладного початку терапії у новонароджених, що покращує прогноз хворих з гострим ураженням нирок. Це стало підставою для пошуку маркерів для раннього виявлення гострого пошкодження нирок.

60 Прототипом способу, що заявляється, є спосіб ранньої діагностики гострого ураження нирок у дітей, який передбачає визначення рівня ІЛ-18 у сечі порівняно з традиційною діагностикою

патології нирок за сироватковим креатиніном, що дає змогу на 48-72 год. раніше підтвердити наявність ураження нирок [11].

В основу корисної моделі поставлена задача в оптимізації ранньої діагностики ураження нирок у новонароджених з асфіксією шляхом включення до комплексу обстеження визначення рівня ІЛ-18 у сечі на 1-2 добу життя, що дозволить швидко вирішити питання адекватної терапії хворого.

Поставлена задача вирішується тим, що у відомому способі діагностики ураження нирок, який передбачає визначення ІЛ-18 у сечі дітей, згідно з корисною моделлю, визначення рівня інтерлейкіну-18 у сечі немовлят здійснюють на 1-2 добу життя немовляти імунферментним методом на автоматичному аналізаторі. При цьому, якщо рівень ІЛ-18 складає від 12,89 до 16,23 пг/мл діагностують ураження нирок внаслідок помірної асфіксії, а при рівні ІЛ-18 від 25,29 до 35,81 пг/мл діагностують ураження нирок внаслідок тяжкої асфіксії.

Спосіб діагностики ураження нирок у новонароджених з асфіксією, що заявляється, здійснюється наступним чином.

Згідно з наказом МОЗ України від 08.06.2007 року № 312 "Первинна реанімація і післяреанімаційна допомога новонародженим", усі новонароджені з асфіксією одразу після народження отримують неонатологічну допомогу, після чого оцінка загального стану дитини визначається з урахуванням перебігу вагітності та пологів, стану після народження (оцінки за шкалою Апгар, наявності ознак порушення функцій центральної нервової системи, дихальної, серцево-судинної та сечовидільної систем протягом перших трьох діб життя), лабораторних (показники сечовини та креатиніну в крові, клінічний аналіз сечі, рН крові) та інструментальних (УЗД) даних.

Для дослідження у стерильний сечоприймач збиралася ранкова порція сечі між 8 та 10 годинами ранку після туалету зовнішніх статевих органів. Активність зазначеного інтерлейкіну визначалася імунферментним методом на автоматичному аналізаторі. Принцип методу полягає у визначенні в досліджуваному субстраті антигенів на основі їх здатності зв'язуватися з антитілами, адсорбованими на поверхні лунок полістиролової планшети. Кількість комплексів антиген - антитіло, що утворилася при цьому, визначають за допомогою індикаторного компонента, в ролі якого використовували кон'югант пероксидази хрому зі стрептавідином. За зміною стану забарвлення субстратної суміші на блакитний визначають ферментативну активність. Інтенсивність кольору пропорційна кількості ІЛ-18 у зразках. Інтенсивність забарвлення визначається в мікропланшетах на спектрофотометрі при довжині хвилі 620 нм, після чого будуються калібрувальні криві та визначається концентрація ІЛ-18 у пробах. Якщо рівень ІЛ-18 складає від 12,89 до 16,23 пг/мл діагностують ураження нирок внаслідок помірної асфіксії, при рівні від 25,29 до 35,81 пг/мл діагностують ураження нирок внаслідок тяжкої асфіксії. Чутливість методу складає 95 %.

Використання заявлюваного способу дозволяє раніше отримати підтвердження ураження нирок у немовлят з асфіксією, використовуючи на 1-2 добу життя неінвазивне визначення вмісту інтерлейкіну-18 у сечі.

Приклад конкретного застосування.

Дитина Д., у віці 1 день, дівчинка. Народилася від I вагітності, I пологів; вік матері 21 рік. Теперішня вагітність мала перебіг на тлі анемії, дріжджового кольпіту. На обліку жінка перебувала з 12 тижня гестації; обстежена на ВІЛ, реакцію Васермана - результати негативні; на TORCH-інфекції не обстежена. УЗД I - вагітність 12 тижнів, УЗД II - вагітність 19 тижнів. УЗД III - вагітність 36 тижнів.

Дівчинка народилася у строк гестації 40 тижнів, навколоплідні води світлі, плацента без особливостей. Оцінка за Апгар 2/4 бали; маса дитини при народженні 3020 г, довжина 50 см. Стан після народження тяжкий за рахунок неврологічних порушень, дихальних розладів. У пологовому залі розпочато штучну вентиляцію легень (ШВЛ), дитина переведена у відділення інтенсивної терапії. Дитина обстежена: клініко-лабораторних даних, що свідчать про наявність у дитини TORCH-інфекції, вроджених вад розвитку або генетичної патології не виявлено; негативні показники неспецифічних ознак запалення в клінічному аналізі крові; біохімічні показники не відхилені від норми (рівень креатиніну сироватки 75 мкмоль/л, калій 4,83 ммоль/л), діурез 1,0 мл/кг/год. При огляді стан дитини тяжкий: самостійне дихання відсутнє (виконується ШВЛ), адинамія, пригнічення рефлексів, судомний синдром, відмічається метаболічний ацидоз, артеріальна гіпотензія, пастозність гомілок і стоп. Висновок нейросонографії (НСГ): ознаки набряку головного мозку, УЗД нирок - без особливостей.

Як видно із даного прикладу, за результатами анамнестичних даних, вкрай неспецифічної клінічної картини захворювання, результатів лабораторних, інструментальних методів досліджень (УЗД) тяжко достовірно зазначити наявність ураження нирок. Саме тому на 1 добу

життя дитині до загальноприйнятої схеми обстеження призначають додатково імуноферментне дослідження сечі на рівень ІЛ-18.

5 Перед використанням всі реагенти та зразки приводяться до кімнатної температури (18-25 °С). У відповідні лунки вноситься по 50 мкл зразка сечі або 50 мкл кожного стандарту. Після цього в усі лунки, що містять стандарти та зразки, додається по 50 мкл антитіла (загальний реакційний об'єм дорівнює 100 мкл). Потім суміш інкубується при кімнатній температурі 1,5 години без струшування. Після 5 разового промивання відповідним розчином (по 300 мкл на кожну лунку) в кожну лунку додається по 100 мкл розчину стрептавідіну - пероксидази хрому. 10 Надалі необхідно інкубувати протягом 30 хвилин при кімнатній температурі, потім знову промити 5 разів розчином для промивання (300 мкл на кожну лунку) та додати в кожну лунку по 50 мкл готового до використання реагенту субстрату. В подальшому суміш інкубується протягом 15 хвилин при кімнатній температурі в темряві, після чого в кожну лунку вноситься по 25 мкл стоп-розчину. Вимірювання необхідно здійснити при 620 нм не пізніше 15 хвилин після зупинки реакції. Для цього будується калібрувальна крива, використовуючи програмне забезпечення аналізатора (або вручну). Калібрувальна крива створюється нанесенням середньої оптичної густини, отриманої для кожної з концентрацій стандартів на вертикальній (Y) осі, проти відповідного рівня ІЛ-18 (пг/мл) на горизонтальній (X) осі. Калібрувальна крива необхідна для визначення кількості ІЛ-18 у невідомому зразку.

20 За результатами встановлено, що вміст ІЛ-18 у сечі становить 35,5 пг/мл, що свідчить про ураження нирок внаслідок тяжкої асфіксії. Таким чином, у дитини можливе встановлення діагнозу: перинатальне гіпоксичне ураження ЦНС тяжкого ступеня, набряк мозку, судомний синдром, синдром дихальних розладів III ст., нефропатія, що у подальшому обумовлює адекватну терапію зазначеного стану з урахуванням існуючих протоколів лікування.

25 Зазначена неінвазивна методика підтверджує її високу ефективність, навіть за умови критичного стану дитини.

Для вивчення ефективності зазначеного способу, проведено лабораторне обстеження 20 малюків, що не мали асфіксії при народженні (група порівняння) та 100 доношених новонароджених із гестаційним віком 38-41 тиж. і ознаками ушкодження нирок. Немовлят з асфіксією розподілили на 2 групи: 50 дітей, які перенесли тяжку асфіксію, та 50 дітей з помірною асфіксією.

Визначення ІЛ-18 в сечі порівнювали з традиційним методом діагностики ураження нирок за сироватковим креатиніном.

35 На 1-2 добу життя не виявлено достовірної різниці за креатиніном сироватки між обстеженими новонародженими з асфіксією ($72,17 \pm 4,66$ та $74,51 \pm 4,77$ мкмоль/л у немовлят, які перенесли помірну та тяжку асфіксію відповідно) і групою порівняння ($61,44 \pm 4,66$ мкмоль/л).

Найбільш вірогідно це пов'язано з впливом материнського креатиніну на рівень у малюків після народження. Отже, визначення креатиніну в сироватці крові не дозволяє виявити наявність ураження нирок і зниження їх фільтраційної функції в перші 24-48 годин після народження у дітей, які зазнавали впливу асфіксії.

40 У новонароджених із порушенням функції нирок на тлі асфіксії після народження вміст ІЛ-18 перевищував показники здорових дітей. На 1-2 добу життя вміст ІЛ-18 в сечі був майже в 4,5 раза вищим ($14,56 \pm 0,83$ пг/мл, $p < 0,05$) у разі помірної та у 9 разів вищим ($30,55 \pm 2,62$ пг/мл, $p < 0,05$) у разі тяжкої асфіксії. Таким чином, ІЛ-18 сечі може бути раннім предиктором ниркової дисфункції у новонароджених, які зазнавали впливу асфіксії. Крім того, наявність різниці між 45 групами новонароджених із асфіксією вказує на залежність вираженості ушкодження ниркових каналців від ступеня тяжкості асфіксії. Значний вміст ІЛ-18 в сечі у дітей з тяжкою асфіксією свідчить про суттєве ушкодження епітелію проксимальних ниркових каналців.

Розрахунок коефіцієнта рангової кореляції Спірмена ІЛ-18 сечі та креатиніну сироватки крові засвідчив відсутність зв'язку між зазначеними показниками на 1-2 добу життя. Враховуючи неінвазивність методу визначення ІЛ-18, йому слід віддавати перевагу, особливо у новонароджених у критичному стані.

55 За допомогою дисперсійного аналізу Фрідмана встановлено, що на концентрацію ІЛ-18 в сечі, як у дітей групи порівняння, так новонароджених з асфіксією, суттєво впливає вік дитини, але вона не залежить від маси тіла при народженні та статі. Таким чином, гестаційний вік дитини найбільшою мірою впливає на постнатальну адаптацію та функціональний стан ниркової тканини у немовлят з асфіксією.

Крім того, рівень ІЛ-18 у сечі новонароджених із асфіксією може бути критерієм визначення ступеня тяжкості ураження нирок.

Так, ранніми діагностичними критеріями ураження нирок внаслідок помірної асфіксії доцільно вважати рівень ІЛ-18 сечі на 1-2 добу життя 12,89 16,23 пг/мл. Про ураження нирок внаслідок тяжкої асфіксії свідчить рівень ІЛ-18 сечі на 1-2 добу життя 25,29-35,81 пг/мл.

5 Таким чином, використання способу, що заявляється, дозволяє покращити ранню діагностику ураження нирок у новонароджених з асфіксією уже на 1-2 добу життя, за рахунок об'єктивізації діагностики та визначення вмісту антерлейкіну-18 у сечі, що є неінвазивною процедурою та дозволяє швидко вирішити питання адекватної терапії хворого.

Джерела інформації:

- 10 1. Kurinczuk J.J. Epidemiology of neonatal encephalopathy and hypoxic-ischaemic encephalopathy / Kurinczuk J.J., White-Koning M., Badawi N. // Early Hum. Dev. - 2010. - Vol. 86. - P. 329-338.
- 15 2. The American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Neonatal Encephalopathy and Cerebral Palsy, the American College of Obstetricians and Gynecologists, the American Academy of Pediatrics. Neonatal encephalopathy and cerebral palsy: defining the pathogenesis and pathophysiology. Washington, DC: the American College of Obstetricians and Gynecologists, 2003:1-85.
3. Shah P. Multiorgan dysfunction in infants with post-asphyxial hypoxic-ischaemic encephalopathy / P. Shah, S. Riphagen, J. Beyene, M. Perlman // Arch. Dis. Child. Fetal. Neonatal. - 2004. - Vol.89. - P. 152-155.
- 20 4. Gupta B.D. Renal Failure in Asphyxiated Neonates / B.D. Gupta, P. Sharma, J. Bagla, M. Parakh, J.P. Soni // Indian Pediatrics. - 2005. Vol. 42. - P. 928-934.
5. Andreoli S.P. Acute renal failure in the newborn / Andreoli S.P. // Semin. Perinatol. - 2004. - № 8. - P. 112-123.
- 25 6. Чугунова О.Л. Современные методы лабораторной диагностики нефрологической патологии у новорожденных / Чугунова О.Л., Вербицкий В.И. // Дет. болезни. - 2001. - № 1. - С. 16-20.
7. Askenazi D.J. Acute kidney injury in critically ill newborns: What do we know? What do we need to learn? / Askenazi D.J., Ambalavanan N., Goldstein S.L. // Pediatr. Nephrol. - 2009. - Vol. 24. - P. 265-274.
- 30 8. Simon J. Interpreting the estimated glomerular filtration rate in primary care: benefits and pitfalls / Simon J., Amde M., Poggio E.D. // Clev. Clin. J. Med. - 2011. Vol.78, № 3. - P. 189-195.
9. Lisowska-Myjak B. Serum and Urinary Biomarkers of Acute Kidney Injury / B.Lisowska-Myjak // Blood Purif. - 2010. - Vol. 29. - P. 357-365.
- 35 10. Parikh C.R. Urine IL-18 is an early diagnostic marker for acute kidney injury and predicts mortality in the intensive care unit / Parikh C.R., Abraham E., Ancukiewicz M., Edelstein C.L. // J. Am. Soc. Nephrol. 2005. - Vol. 16. - P. 3046-3052.
11. Washburn K.K. Urinary interleukin-18 is an acute kidney injury biomarker in critically ill children / Washburn K.K, Zappitelli M., Arian A.A. et al. // Nephrol. Dial. Transplant. - 2008. - Vol. 23. - P. 566-572.

40 ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб неінвазивної діагностики порушення функції нирок у новонароджених із асфіксією шляхом визначення рівня інтерлейкіну-18 у сечі немовлят, який **відрізняється** тим, що визначення рівня інтерлейкіну-18 у сечі немовлят здійснюють на 1-2 добу життя немовляти імуноферментним методом на автоматичному аналізаторі, при цьому, якщо рівень ІЛ-18 складає від 12,89 до 16,23 пг/мл, діагностують ураження нирок внаслідок помірної асфіксії, а при рівні ІЛ-18 від 25,29 до 35,81 пг/мл діагностують ураження нирок внаслідок тяжкої асфіксії.

Комп'ютерна верстка М. Шамоніна

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