

**ОПИСАНИЕ
ИЗОБРЕТЕНИЯ
К ПАТЕНТУ**

(12)

РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ



НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ
СОБСТВЕННОСТИ

(19) **ВУ** (11) **23131**

(13) **С1**

(46) **2020.08.30**

(51) МПК

A 61B 10/00 (2006.01)

G 01N 33/487 (2006.01)

(54) **СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РИСКА РАЗВИТИЯ ПЕРИТОНИТА У ПАЦИЕНТА С ХРОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ ПОЧЕК, НАХОДЯЩЕГОСЯ НА ПЕРИТОНЕАЛЬНОМ ДИАЛИЗЕ**

(21) Номер заявки: а 20180312

(22) 2018.07.04

(43) 2020.02.28

(71) Заявитель: Учреждение образования "Гомельский государственный медицинский университет" (ВУ)

(72) Авторы: Лызиков Анатолий Николаевич; Новикова Ирина Александровна; Петренко Татьяна Станиславовна; Берещенко Валентин Владимирович; Мелеш Татьяна Николаевна (ВУ)

(73) Патентообладатель: Учреждение образования "Гомельский государственный медицинский университет" (ВУ)

(56) RU 2449273 C1, 2012.

АНДРУСЕВ А.М. Нефрология и диализ. - 2005. - Т. 7. - № 2. - С. 110-129.

LU Y.-A. et al. PLoS ONE. - 2017. - V. 12.

WANG Q. et al. American Journal of Kidney Diseases. - 2003. - V. 41. - No. 3. - P. 664-669.

WU H. et al. Perit. Dial. Int.. - 2016. - V. 36. - No. 6. - P. 640-646.

ПЕТРЕНКО Т.С. и др. Лабораторная диагностика. Восточная Европа. -2017. - Т. 6. - № 2. - С. 224-231.

(57)

Способ определения риска развития перитонита у пациента с хронической болезнью почек, находящегося на перитонеальном диализе, заключающийся в том, что осуществляют забор перитонеального диализата и венозной крови пациента, готовят контрольную пробу, содержащую физиологический раствор, раствор сернокислого железа в концентрации 25 мМ, 0,1 %-ный раствор люминола, 3 %-ный раствор перекиси водорода и трис-буфер с рН 8,8 в соотношении 1:1:1:1:10, и две исследуемые пробы, содержащие вместо физиологического раствора перитонеальный диализат либо плазму крови пациента, определяют интенсивность вспышки люминолзависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ) в контрольной пробе I_{\max_k} и исследуемых пробах I_{\max_o} , рассчитывают степень угнетения интенсивности вспышки ЛЗХЛ для каждой исследуемой пробы по формуле:

$$((I_{\max_k} - I_{\max_o}) / I_{\max_k}) \times 100 \%,$$

и при значении степени угнетения интенсивности вспышки ЛЗХЛ в пробе, содержащей плазму крови, равном 43 % или более, и в пробе, содержащей перитонеальный диализат, равном 36 % или более, судят о минимальном риске развития перитонита, а при значении степени угнетения интенсивности вспышки ЛЗХЛ в пробе, содержащей плазму крови, менее 43 %, и в пробе, содержащей перитонеальный диализат, менее 36 %, судят о высоком риске развития перитонита.

Изобретение относится к медицине, в частности к нефрологии, хирургии и клинической лабораторной диагностике, и может быть использовано для определения риска развития перитонита у пациентов с хронической болезнью почек (ХБП), находящихся на перитонеальном диализе.

В настоящее время существует основной способ оценки риска развития диализного перитонита у пациентов с ХБП - на основании клинколабораторных данных. При этом отсутствие клинических проявлений в виде болей в животе, симптомов напряжения брюшины и др. одновременно с отсутствием помутнения перитонеального диализата, температурной реакции, изменений со стороны общего анализа крови (лейкоцитоз, ускоренное СОЭ) расценивается как состояние отсутствия диализного перитонита. Однако такая оценка риска воспалительного процесса в брюшной полости (перитонита) приемлема только при выраженном обострении и/или при наличии осложнений. Кроме того, при ХБП у пациентов отмечается снижение реактивности организма, поэтому степень активности воспаления не соответствует наблюдаемым в рутинных лабораторных анализах изменениям [1].

Из известных способов наиболее близким к предлагаемому является способ определения активности воспалительного процесса у пациентов с увеитами, заключающийся в том, что регистрируют уровень люминолзависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ) осадка и супернатанта слезной жидкости. Определяют светимость осадка и суммарную антиокислительную активность супернатанта, для чего определяют светосумму свечения железоиндуцированной хемилюминесценции стабильной модельной системы на цитрат-фосфатном буфере в присутствии супернатанта, вычисляют ее значение в процентах от контроля. При значениях светимости осадка более $8,75 \pm 3,91$ усл. ед. и суммарной антиоксидантной активности супернатанта менее 25 % воспалительный процесс определяют как активный, при значениях светимости осадка $8,75 \pm 3,91$ - $1,83 \pm 0,85$ усл. ед. и суммарной антиоксидантной активности супернатанта 25-50 % воспалительный процесс определяют как субактивный, при значениях светимости осадка $1,83 \pm 0,85$ усл. ед. и менее условных единиц и суммарной антиоксидантной активности супернатанта 50 % и более воспалительный процесс определяют как неактивный [2] (прототип).

Недостатками данного способа является то, что он применим лишь для пациентов с поражением глаз и не может быть использован у пациентов с ХБП. Кроме того, при формировании рецидива заболевания он учитывает только влияние местных факторов реактивности организма.

Задача, на решение которой направлено предлагаемое изобретение, заключается в разработке способа определения риска развития перитонита у пациентов с ХБП, находящихся на перитонеальном диализе с целью повышения точности, упрощения и сокращения времени оценки фатальных осложнений.

Технический результат способа заключается в повышении точности и объективности полученной клинической информации.

Поставленная задача достигается способом определения риска развития перитонита у пациента с хронической болезнью почек, находящегося на перитонеальном диализе, заключающимся в том, что осуществляют забор перитонеального диализата и венозной крови пациента, готовят контрольную пробу, содержащую физиологический раствор, раствор сернокислого железа в концентрации 25 мМ, 0,1 %-ный раствор люминола, 3 %-ный раствор перекиси водорода и трис-буфер с рН 8,8 в соотношении 1:1:1:10, и две исследуемые пробы, содержащие вместо физиологического раствора перитонеальный диализат либо плазму крови пациента, определяют интенсивность вспышки люминолзависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ) в контрольной пробе I_{\max_k} и исследуемых пробах I_{\max_0} , рассчитывают степень угнетения интенсивности вспышки ЛЗХЛ для каждой исследуемой пробы по формуле:

$$((I_{\max_k} - I_{\max_0}) / I_{\max_k}) \times 100 \%,$$

и при значении степени угнетения интенсивности вспышки ЛЗХЛ в пробе, содержащей плазму крови, равном 43 % или более, и в пробе, содержащей перитонеальный диализат, равном 36 % или более, судят о минимальном риске развития перитонита, а при значении степени угнетения интенсивности вспышки ЛЗХЛ в пробе, содержащей плазму

крови, менее 43 % и в пробе, содержащей перитонеальный диализат, менее 36 %, судят о высоком риске развития перитонита.

Способ выполняют следующим образом. У пациентов с хронической болезнью почек, находящихся на перитонеальном диализе, забирают биологический материал: венозную кровь после проведения перитонеального диализа центрифугируют 10 мин при 1500 об./мин (500 г), плазму используют для исследования и перитонеальный диализат, который собирают после перитонеального диализа в пробирку с гепарином (из расчета 15-20 ЕД гепарина на 1 мл исследуемого материала). Собранный биоматериал используют для анализа. Регистрацию параметров люминолзависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ) в присутствии перитонеального диализата и плазмы крови осуществляют на флюориметре/спектрофотометре CaryEclipse FL1002M003 в течение 3 мин. Ежедневно параллельно с опытными пробами проводят контрольные исследования. В кювету прибора вносят 1 мл трис-буфера (рН = 8,8), 0,1 мл 25 ммоль/л раствора сернокислого железа, 0,1 мл 0,1 %-ного раствора люминола, 0,1 мл физиологического раствора (контроль) или 0,1 мл биологического материала и 0,1 мл 3 %-ного раствора перекиси водорода. Весь процесс регистрации ЛЗХЛ и обработки результатов проводится автоматически, что повышает точность и объективность полученной информации. Полученные данные обрабатывают предлагающейся к прибору программой и фиксируют в цифрах и графически.

Учитывают один из основных показателей ЛЗХЛ - степень угнетения интенсивности вспышки (I_{max}), который рассчитывают по формуле:

$$((I_{max_k} - I_{max_0}) / I_{max_k}) \times 100 \%,$$

где I_{max_k} - интенсивность вспышки контрольной (радикалообразующей) смеси, I_{max_0} - интенсивность вспышки опытной пробы.

Результат вычисления выражают в процентах относительно контроля. При значении интенсивности вспышки в пробе, содержащей плазму крови, равном 43 % или более, и в пробе, содержащей перитонеальный диализат, равном 36 % или более, риск развития перитонита минимальный, а при значении интенсивности вспышки в пробе, содержащей плазму крови, менее 43 %, и в пробе, содержащей перитонеальный диализат, менее 36 %, отмечается высокий риск развития диализного перитонита.

Нами был проведен анализ степени угнетения интенсивности вспышки ЛЗХЛ в плазме крови и перитонеальном диализате у пациентов с ХБП, находящихся на перитонеальном диализе, при этом было установлено, что при высоком риске развития перитонита степень появления интенсивности вспышки в плазме крови составил 21-43 % от контроля, в перитонеальном диализате 15-36 % от контроля. При низком риске развития воспалительного процесса брюшины (перитоните) интенсивность вспышки модельной системы в присутствии плазмы крови составила 44-53 % от контрольных значений, а в присутствии перитонеального диализата - 37-41 % от контроля.

Для определения пороговых значений интенсивности вспышки ЛЗХЛ был проведен логистический регрессионный анализ с построением ROC кривых с использованием программы SPSS 17.0 for Windows. При этом были определены пороговые значения I_{max} в присутствии плазмы крови, которые составили 43 % или более, в присутствии перитонеального диализата I_{max} - 36 % или более, что характеризует низкий риск развития перитонита, а значения ниже указанных соответствуют высокому риску развития перитонита.

Пример 1.

Пациентка Л., 63 года, поступила в отделение нефрологии и гемодиализа 02.05.2018 г. с диагнозом: ХБП-5Д, ИБС: атеросклеротический кардиосклероз. Недостаточность МК 3 ст., ТК 3 ст., АоК 1 ст. Артериальная гипертензия 3 ст., риск 4, Н-2А. Вторичная анемия легкой степени.

Пациентка находилась на постоянном амбулаторном перитонеальном диализе с 2017 года.

При поступлении выполнены лабораторные методы исследования.

ВУ 23131 С1 2020.08.30

Общий анализ крови: эритроциты - $3,9 \times 10^{12}/л$, гемоглобин - 110 г/л, лейкоциты - $7,4 \times 10^9/л$, эозинофилы - 4 %, нейтрофилы палочкоядерные - 1 %, нейтрофилы сегментоядерные - 84 %, лимфоциты - 7 %, моноциты - 4 %, СОЭ 55 мм/ч.

03.05.18 - Биохимический анализ крови: общий белок - 63 г/л, альбумин - 31,3 г/л, мочевины - 20,5 ммоль/л, креатинин - 0,403 ммоль/л, мочевая кислота - 256,4 ммоль/л, холестерин общий - 6,5 ммоль/л, кальций - 1,94 ммоль/л, натрий - 142 ммоль/л, калий - 4,1 ммоль/л, хлориды - 104 ммоль/л, фосфор - 1,2 ммоль/л, железо - 6,7 мкмоль/л.

Пациентке были определены параметры люминолзависимой хемилюминесценции плазмы крови и перитонеального диализата. Взятие биологического материала осуществляли после проведения перитонеального диализата. Для проведения анализа в кювету спектрофотометра/флюориметра CaryEclipse FL1002M003 вносили 1,2 мл приготовленной ex tempore тест-системы, добавляли 0,1 мл биоматериала (плазма крови или перитонеальный диализат), перемешивали и регистрировали интенсивность вспышки (I_{max}) в течение не менее 3 мин.

Рассчитывали степень подавления ЛЗХЛ в присутствии биологического материала относительно контроля по формуле:

$$((I_{max_k} - I_{max_0}) / I_{max_k}) \times 100 \%,$$

$$I_{max} \text{ в плазме крови} = ((3,74 - 2,59) / 3,74) \times 100 \% = 21,7 \%,$$

I_{max} в перитонеальном диализате $((3,74 - 2,96) / 3,74) \times 100 \% = 20,8 \%$, что говорит о высоком риске развития перитонита.

При наблюдении в динамике за данной пациенткой через 28 ч после определения параметров ЛЗХЛ у нее развился диализный перитонит.

Пример 2.

Пациент В., 60 лет, поступил в отделение нефрологии и гемодиализа 26.04.2018 г. с диагнозом: ХБП 5 Д. Артериальная гипертензия 3 ст., риск 4. Ишемическая нефропатия. Вторичная анемия легкой степени тяжести.

С 2012 года пациент находится на постоянном амбулаторном перитонеальном диализе.

Выполнены лабораторные методы исследования.

27.04.18 - Общий анализ крови: эритроциты - $3,8 \times 10^{12}/л$, гемоглобин - 111 г/л, лейкоциты - $16,7 \times 10^9/л$, эозинофилы - 1 %, нейтрофилы палочкоядерные - 4 %, нейтрофилы сегментоядерные - 73 %, лимфоциты - 17 %, моноциты - 5 %, СОЭ 50 мм/ч.

27.04.18 - Биохимический анализ крови: общий белок - 53 г/л, альбумин - 31,3 г/л, мочевины - 10,6 ммоль/л, креатинин - 0,09 ммоль/л, мочевая кислота - 452,2 ммоль/л, холестерин общий - 3,95 ммоль/л, билирубин общий - 5,2 ммоль/л, глюкоза - 6,59 ммоль/л, АсАТ - 19,3 ед/л, АлАТ - 22,6 ед/л, кальций - 1,8 ммоль/л, натрий - 141 ммоль/л, калий - 5,1 ммоль/л, хлориды - 105 ммоль/л, фосфор - 2,3 ммоль/л, железо - 7,3 ммоль/л. Кроме этого, пациенту были определены параметры люминолзависимой хемилюминесценции плазмы крови и перитонеального диализата. Взятие биологического материала осуществляли после проведения перитонеального диализата. Для проведения анализа в кювету спектрофотометра/флюориметра CaryEclipse FL1002M003 вносили 1,2 мл приготовленной ex tempore тест-системы, добавляли 0,1 мл биоматериала (плазма крови или перитонеальный диализат), перемешивали и регистрировали интенсивность вспышки (I_{max}) в течение не менее 3 мин.

Рассчитывали степень подавления ЛЗХЛ в присутствии биологического материала относительно контроля по формуле:

$$((I_{max_k} - I_{max_0}) / I_{max_k}) \times 100 \%,$$

$$I_{max} \text{ (плазмы крови)} = ((3,24 - 1,49) / 3,24) \times 100 \% = 54,0 \%,$$

I_{max} (перитонеального диализата) $((3,24 - 1,86) / 3,24) \times 100 \% = 42,6 \%$, что говорит о низком риске развития перитонита.

При дальнейшем наблюдении за пациентом перитонит у него не наблюдался.

ВУ 23131 С1 2020.08.30

Предлагаемый способ определения риска развития перитонита у пациентов с ХБП, находящихся на перитонеальном диализе, способствует достоверности и расширению диагностических возможностей. Использование способа в клинической практике позволяет на ранних этапах (до развития клинических проявлений) оценить риск развития воспалительного процесса в брюшине и назначить превентивную терапию, что снизит риск развития перитонита.

Способ прост в выполнении, чувствителен, информативен, доступен и легко выполнимым в любом учреждении здравоохранения, где есть биохимическая лаборатория, оборудованная прибором для регистрации сверхслабого свечения, и не требует большого количества биологического материала. Все реагенты могут быть приготовлены в любой клинико-диагностической лаборатории, к тому же использование плазмы крови и перитонеального диализата одновременно повышает клиническую информативность исследования и диагностические возможности хемилюминесцентного анализа биологических материалов.

Источники информации:

1. Гуревич К.Я. с соавт. Перитонеальный диализ (пособие для врачей). Изд. 2-е, перераб. и доп. СПб, 2003.
2. Патент RU 2192009 С2, МПК G 01N 33/52 G 01N 33/48.