



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 180 965** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) МПК⁷ **G 01 N 33/53, 33/48**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ**

(21), (22) Заявка: 2000117515/14, 03.07.2000
(24) Дата начала действия патента: 03.07.2000
(46) Дата публикации: 27.03.2002
(56) Ссылки: COOPER E.W., JACKSON B.J. Rapid analysis of proteinuria usiny SDS graten PAGE and Applicatia ot phast system electrophoresis in the animals of proteinuria. Ann. Clin. Biochem., 1987, V. 24, pp.122-123. RU 2007729 C1, 15.02.1994. RU 2069857 C1, 27.11.1996. RU 2069000 C1, 10.11.1996. RU 2064181 C1, 20.07.1996. RU 94022815 A1, 20.08.1996.
(98) Адрес для переписки:
394000, г. Воронеж, ул. Студенческая, 10,
Воронежская государственная медицинская академия им. Н.Н. Бурденко, патентный отдел

(71) Заявитель:
Габбасова Наталья Вадимовна,
Жмаев Александр Федорович
(72) Изобретатель: Габбасова Н.В.,
Жмаев А.Ф., Настаушева Т.Л., Чернов Ю.Н., Стахурлова Л.И., Швырев А.П.
(73) Патентообладатель:
Габбасова Наталья Вадимовна,
Жмаев Александр Федорович

(54) СПОСОБ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПОЧЕК

(57) Реферат:
Изобретение относится к медицине, в частности к нефрологии. Способ обеспечивает повышение точности дифференциальной диагностики заболеваний почек. Проводят исследование белков мочи методом автоматизированного электрофореза в градиентном 8-25% полиакриламидном геле с детергентом додецил сульфатом натрия, при этом белковые фракции исследуют в диапазоне мол. м. от 10 до 330 кДа и при сочетании белковых фракций мол. м. 25-27 кДа - α_1 -микроглобулин, α_1 -кислый гликопротеид и 58-75 кДа - преальбумин, альбумин, постальбумин диагностируют норму, а при выделении белковых фракций мол. м. 58-75 кДа - преальбумин, альбумин, постальбумин, 76-160 кДа - трансферрин, мономер ТНР, гаптоглобин, димерный А1, иммуноглобулин G и 161-330 кДа - фракция иммуноглобулинов диагностируют гломерулопатию, при сочетании белковых фракций мол. м. 10-24 кДа - γ -следовый

протеин, β_2 -микроглобулин, рибонуклеаза, лизоцим, мономерный гемоглобин, ретинол-связывающий белок, 58-75 кДа - преальбумин, альбумин, постальбумин, 76-160 кДа - трансферрин, мономер ТНР, гаптоглобин, димерный А1, иммуноглобулин G и 161-330 кДа - фракция иммуноглобулинов - диагностируют сочетанные поражения клубочков и канальцев, то есть гломерулонефрит с тубулоинтерстициальным компонентом, при выделении уропротеинов мол. м. 10-24 кДа - γ -следовый протеин, β_2 -микроглобулин, рибонуклеаза, лизоцим, мономерный гемоглобин, ретинол-связывающий белок, 25-27 кДа - α_1 -микроглобулин, α_1 -кислый гликопротеид, 58-75 кДа - преальбумин, альбумин, постальбумин, 76-160 кДа - трансферрин, мономер ТНР, гаптоглобин, димерный А1, иммуноглобулин G диагностируют тубулоинтерстициальные нефриты и тубулопатию. 3 табл.

RU 2 180 965 C1

RU 2 180 965 C1



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 180 965** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) Int. Cl.⁷ **G 01 N 33/53, 33/48**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 2000117515/14, 03.07.2000
(24) Effective date for property rights: 03.07.2000
(46) Date of publication: 27.03.2002
(98) Mail address:
394000, g. Voronezh, ul. Studencheskaja, 10,
Voronezhskaja gosudarstvennaja meditsinskaja
akademija im. N.N. Burdenko, patentnyj otdel

(71) Applicant:
Gabbasova Natal'ja Vadimovna,
Zhmaev Aleksandr Fedorovich
(72) Inventor: Gabbasova N.V.,
Zhmaev A.F., Nastausheva T.L., Chernov
Ju.N., Stakhurlova L.I., Shvyrev A.P.
(73) Proprietor:
Gabbasova Natal'ja Vadimovna,
Zhmaev Aleksandr Fedorovich

(54) **METHOD OF DIFFERENTIATED PREDICTION OF RENAL DISEASES**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, nephrology. SUBSTANCE: the method deals with testing urinary proteins by automatically controlled electrophoresis in a gradient 8-25%-polyacrylamide gel with dodecyl sodium sulfate detergent. Moreover, protein fractions are studied within 10-330 kDa range. At combining protein fractions of 25-27 kDa mol. weight- α_1 -microglobulin, α_1 -acid glycoproteide and 58-75 kDa-prealbumin, albumin, postalbumin the standard is diagnosed. At determining protein fractions of 58-75 kDa mol. weight-prealbumin, albumin, postalbumin, 76-160 kDa-transferrin, monomer THP, haptoglobin, dimeric A1, immunoglobulins G and 161-330 kDa-immunoglobulins' fraction the glomerulopathies are diagnosed. At combining protein fractions of 10-24 kDa mol. weight - γ trace protein, β_2 -microglobulin, ribonuclease, lysozyme, monomeric

hemoglobin, retinolbinding protein, 58-75 kDa - prealbumin, albumin, postalbumin, 76-160 kDa-transferrin, monomer THP, haptoglobin, dimeric A1, immunoglobulin G and 161-330 kDa-immunoglobulins' fraction - a combinative defects of glomerules and canaliculi are diagnosed, that is glomerulonephritis with tubulointerstitial component, at determining uroproteins of 10-24 kDa mol. weight - γ trace protein, β_2 -microglobulin, ribonuclease, lysozyme, monomeric hemoglobin, retinolbinding protein, 25-27 kDa- α_1 -microglobulin, α_1 -acid glycoproteide, 58-75 kDa-prealbumin, albumin, postalbumin, 76-160 kDa-transferrin, monomer THP, haptoglobin, dimeric A1, immunoglobulin G the tubulointerstitial nephritis and tubulopathies are diagnosed. EFFECT: higher accuracy of differentiated diagnostics of renal diseases. 3 tbl

RU 2 180 965 C1

RU 2 180 965 C1

Изобретение относится к медицине, в частности к нефрологии, и может быть использовано для улучшения диагностики нефропатий, дифференциальной диагностики гломерулопатий, бактериальных и абактериальных тубулоинтерстициальных нефритов.

Известен способ диагностики состояния нефрона при помощи разделения белка мочи на отдельные фракции методом электрофореза в полиакриламидном геле с додецил сульфатом натрия (1).

Данный метод используется для определения уровня поражения нефрона (клубочек, каналец или их сочетание). При этом выделяют клубочковый, канальцевый или смешанный тип протеинурии.

Поражение клубочков диагностируется в том случае, если в выделенных фракциях белка мочи преобладают альбумины (молекулярная масса 67 кДа) и высокомолекулярные белки (молекулярная масса выше 67 кДа). Канальцевый тип нарушений устанавливается, если в уротеинограмме присутствуют низкомолекулярные белки - микроглобулины (молекулярная масса ниже 40 кДа). Смешанное поражение (клубочков и канальцев) выявляется в случае присутствия в уротеинограмме и высокомолекулярных и низкомолекулярных белков (2).

Однако недостатком данного способа является трудность интерпретации степени поражения различных отделов нефрона (клубочка, канальца), особенно при умеренной и минимальной протеинурии (менее 2,5 г/сутки).

Цель настоящего изобретения состоит в повышении точности диагностики степени поражения различных отделов нефрона при нефропатиях (гломерулонефрит, пиелонефрит, тубулоинтерстициальный нефрит).

Указанная цель достигается тем, что при проведении исследования белков мочи методом автоматизированного электрофореза в полиакриламидном геле с додецил сульфатом натрия, нами получено до 30 белковых фракций в диапазоне молекулярных масс от 10 до 330 кДа, включающего в себя клубочковые и канальцевые протеины. По их соотношению можно определить уровень и степень поражения различных отделов нефрона.

При молекулярной массе 25-57 кДа (α_1 -микроглобулин и α_1 -кислый гликопротеид) и 58-75 кДа (преальбумин, альбумин, постальбумин) поражения почек не отмечалось. При молекулярной массе 58-75 кДа (преальбумин, альбумин, постальбумин), 76-160 кДа (трансферрин, мономер ТНР (Tamm-Horsfall-Protein), гаптаглобин, димерный A_1 , Jg G), 161-330 кДа (фракция иммуноглобулинов) выявлялись гломерулопатии. При молекулярной массе 10-24 кДа (γ -следовой протеин, β_2 -микроглобулин, рибонуклеаза, лизоцим, мономерный гемоглобин, ретинол-связывающий белок), 58-75 кДа (преальбумин, альбумин, постальбумин), 76-160 кДа (трансферрин, мономер ТНР (Tamm-Horsfall-Protein), гаптаглобин,

димерный A_1 , иммуноглобулин G) и 161-330 кДа (фракция иммуноглобулинов) - определялось сочетанное поражение клубочков и канальцев, т. е. гломерулонефрит с тубулоинтерстициальным компонентом. При выделении уротеиновых молекулярной массы 10-24 кДа (γ -следовой протеин, β_2 -микроглобулин, рибонуклеаза, лизоцим, мономерный гемоглобин, ретинол-связывающий белок), 25-57 кДа (α_1 -микроглобулин и α_1 -кислый гликопротеид), 58-75 кДа (преальбумин, альбумин, постальбумин), 76-160 кДа (трансферрин, мономер ТНР (Tamm-Horsfall-Protein), гаптаглобин, димерный A_1 , иммуноглобулин G) - тубулоинтерстициальные нефриты и тубулопатии.

Исследование белка мочи проводилось методом автоматизированного электрофореза в градиентном 8-25% полиакриламидном геле с детергентом додецил сульфатом натрия на аппарате Phast System (фирмы Pharmacia, Sweden). Обработка полученных уротеинограмм осуществлялась с помощью сканера Sharp JX 330, персонального компьютера IBM PC с использованием коммерческой программы "Image Master". При статистической обработке результатов исследования для определения достоверности различий показателей использовался критерий t Стьюдента. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Исследования были проведены у 350 детей (25 здоровых и 325 с различными видами нефропатий: гломерулопатиями первичными и вторичными, тубулоинтерстициальными нефропатиями - пиелонефритом, тубулопатиями, тубулоинтерстициальным нефритом).

Критериями оценки состояния нефрона явились различные сочетания выделенных 5 классов уротеинов.

1. Класс микропротеинов (молекулярная масса 10-24 кДа). Среди них установлены следующие белковые фракции: γ -следовой протеин, β_2 -микроглобулин, рибонуклеаза, лизоцим, мономерный гемоглобин, ретинол-связывающий белок.

2. Класс - средние микропротеины (молекулярная масса 25-57 кДа). К ним относятся α_1 -микроглобулин и α_1 -кислый гликопротеид.

3. Класс - альбумины (молекулярная масса 58-75 кДа). Сюда включается преальбумин, альбумин, постальбумин.

4. Класс - среднемолекулярные глобулины (молекулярная масса 76-160 кДа). Эти белки следующего состава: трансферрин, мономер ТНР (Tamm-Horsfall-Protein), гаптаглобин, димерный A_1 , Jg G.

5. Класс включал высокомолекулярные протеины (молекулярная масса 161-330 кДа). Он состоял из фракции иммуноглобулинов. (табл. 1).

При этом установлено 10 видов уротеинограмм (табл. 2).

1-й и 2-й тип уротеинограмм присущ здоровым детям. 3-й, 4-й, 6-й, 9-й - для гломерулопатий. 5-й, 8-й и 9-й - для сочетанного поражения клубочков и канальцев, т.е. гломерулонефритов с

тубулоинтерстициальным компонентом, 7-й тип уропротеинограмм присущ в основном тубулоинтерстициальным нефритам и тубулопатиям.

Как видно из табл. 3, разные виды уропротеинограмм определяют степень дисфункции клубочков и канальцев.

Выявление только класса альбуминов являлось клубочковым физиологическим, сочетание альбуминов и среднемoleкулярных глобулинов указывало на клубочковую протеинурию с умеренной дисфункцией клубочков, сочетание альбуминов, среднемoleкулярных глобулинов и высокомолекулярных протеинов свидетельствовало о выраженной дисфункции клубочков.

Наличие в уропротеинограмме из микропротеинов только средних микропротеинов свидетельствовало о минимальной дисфункции канальцев, определение в УПГ только класса малых микропротеинов свидетельствовало об умеренной дисфункции канальцев, выявление сочетанной экскреции двух классов микропротеинов (малых и средних) свидетельствовало о выраженной дисфункции канальцев.

Пример:

Женя С., 14 лет. История болезни: 7014.

С 3-летнего возраста беспокоят боли в боку. В 1990 году был прооперирован по поводу гидронефроза слева. Операция была эффективной. Контрольные анализы мочи с 1990 по 1995 г.г. - без патологии. Поступил в стационар для контрольного обследования. В ан. мочи по Каковскому-Аддису: белок - (-), л - $5,2 \cdot 10^6$ ($n > 80\%$), эр (-); в пробе по Зимницкому - при диурезе 1233 мл, удельный вес - 1033; проба КОК - на $1,73 \text{ м}^2$ - 342 мл/мин. При минутном диурезе - 3,3 мл. На УЗИ - правая почка в норме; левая почка - ч.л.с, раздроблена, расширена в области лоханки. На урограммах - состояние после эффективной операции по поводу гидронефроза слева, стабилизация процесса. Транзиторно выявлялась протеинурия до $0,231 \text{ г/л}$, АД до $130/75 \text{ мм рт. ст.}$. На уропротеинограммах: определялись белковые фракции молекулярной массой 58-75 кДа, относящиеся к классу альбуминов (альбумин, постальбумин), и молекулярной массой 76-160 кДа, относящихся к классу среднемoleкулярных глобулинов (JgG и др.); что говорит о клубочковой протеинурии с умеренной дисфункцией клубочков, дисфункция канальцев отсутствовала.

Данный пример указывает, что несмотря на клиничко-лабораторную ремиссию пиелонефрита, отсутствие признаков сморщивания левой почки, данные уропротеинограммы указывают на поражение клубочков почки.

В связи с этим ребенок подлежит наблюдению, назначению терапии, направленной на уменьшение

внутриклубочкового давления (например, ингибиторы ангиотензинконвертирующего фермента).

Таким образом, положительный эффект изобретения заключается в повышении точности диагностики поражения различных отделов нефрона (клубочка, канальца), особенно в тех случаях, когда затруднено проведение биопсии.

Литература

1. Cooper E. W. , Jackson B.J. Rapid analysis of proteinuria using SDS gradient PAGE and Application of phast system electrophoresis in the animals of proteinuria // Ann. Clin. Biochem - 1987 - suppl. - v. 24, p. 122-123.

2. Pesce A. J. , Boreisha I., Poolac V. E. Rapid differentiation of glomerular and tubular proteinuria by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. // Clin. Chim. Acta. - 1972 - vol. 40 - p. 27-34.

Формула изобретения:

Способ дифференциальной диагностики заболеваний почек, включающий исследование белков мочи методом автоматизированного электрофореза в градиентном 8-25% полиакриламидном геле с детергентом додецил сульфатом натрия, отличающийся тем, что белковые фракции исследуют в диапазоне мол. м. от 10 до 330 кДа и при сочетании белковых фракций мол. м. 25-27 кДа - α_1 -микроглобулин, α_1 -кислый гликопротеид и 58-75 кДа - преальбумин, альбумин, постальбумин диагностируют норму, а при выделении белковых фракций мол. м. 58-75 кДа - преальбумин, альбумин, постальбумин, 76-160 кДа - трансферрин, мономер ТНР, гаптоглобин, димерный AI, иммуноглобулин G и 161-330 кДа - фракция иммуноглобулинов диагностируют гломерулопатию, при сочетании белковых фракций мол. м. 10-24 кДа - γ следовой протеин, β_2 -микроглобулин, рибонуклеаза, лизоцим, мономерный гемоглобин, ретинол-связывающий белок, 58-75 кДа - преальбумин, альбумин, постальбумин, 76-160 кДа - трансферрин, мономер ТНР, гаптоглобин, димерный AI, иммуноглобулин G и 161-330 кДа - фракция иммуноглобулинов - диагностируют сочетанные поражения клубочков и канальцев, то есть гломерулонефрит с тубулоинтерстициальным компонентом, при выделении уропротеинов мол. м. 10-24 кДа - γ следовой протеин, β_2 -микроглобулин, рибонуклеаза, лизоцим, мономерный гемоглобин, ретинол-связывающий белок, 25-27 кДа

- α_1 -микроглобулин и α_1 -кислый гликопротеид, 58-75 кДа - преальбумин, альбумин, постальбумин, 76-160 кДа - трансферрин, мономер ТНР, гаптоглобин, димерный AI, иммуноглобулин G диагностируют тубулоинтерстициальные нефриты и тубулопатии.

Идентифицированные индивидуальные белковые фракции в уротеинограммах исследованных детей.

№ и/п	Классы протеинов	М. м., кДа	Белковые фракции
1	Первый (малые микропротеины). м. м. 10-24 к Да	10,5 11,7 13,8 14,4 15 21,2	γ-следовой протеин β ₂ -микроглобулин рибонуклеаза лизоцим мономерный гемоглобин ретинол-связывающий белок
2	Второй (средние микропротеины). м. м. 25-57 кДа	27 44	α ₁ -микроглобулин α ₁ -кислый гликопротеид
3	Третий (альбумины), м. м. 58-75 кДа	58 67 72	Преальбумин Альбумин Постальбумин
4	Четвертый (среднемолекулярные глобулины) м. М. 76-160 кДа	76 80 88 128 156	Трансферрин Мономер ТНР Гаптоглобин Димерный А1 IgG
5	Пятый (высокомолекулярные протеины), м.м. 161-330 кДа	-	-

RU 2180965 C1

RU 2180965 C1

Виды уропротеинограмм у детей.

Вид УПГ	ММП* м. М. 10-24 кДа	СМП* м. М. 25-57 кДа	АЛБ* м. М. 58-75 кДа	СМГ* м. М. 76-160 кДа	ВМП* м. М. 161- 330 кДа
Первый			+		
Второй		+	+		
Третий			+	+	
Четвертый		+	+	+	
Пятый	+		+	+	
Шестой			+	+	+
Седьмой	+	+	+	+	
Восьмой	+		+	+	+
Девятый		+	+	+	+
Десятый	+	+	+	+	+

*ММП - малые микропротеины;

СМП - средние микропротеины;

АЛБ - альбумины;

СМГ - среднемолекулярные глобулины;

ВМП - высокомолекулярные протеины;

Таблица 3

Степень дисфункции нефрона по данным уропротеинограмм.

Вид УПГ	Физиол. пр	Клуб. Дисфункция		Канальц. Дисфункция		
		Умер.	Выраж.	Миним.	Умер.	Выраж.
1й	+					
2й	+			+		
3й	+	+				
4й		+		+		
5й		+			+	
6й			+			
7й		+				+
8й			+		+	
9й			+	+		
10 й			+			+

- Примечание: Физиол. пр. – протеинурия, определяемая у здоровых детей