

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(21) Paraiškos numeris: **2022 522**
(22) Paraiškos padavimo data: **2022-06-03**
(41) Paraiškos paskelbimo data: **2023-12-11**
(45) Patento paskelbimo data: **2024-02-26**

(73) Patento savininkas:
Vilniaus Universitetas, Universiteto g. 3, 01513 Vilnius, LT
(72) Išradėjas:
**Julija RAZUMIENĖ, LT
Vidutė GUREVIČIENĖ, LT
Ieva ŠAKINYTĖ, LT
Dalius VITKUS, LT
Aistė KIELAITĖ-GULLA, LT
Kęstutis STRUPAS, LT**
(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:
Otilija KLIMAITIENĖ, 35, AAA Law, A. Goštauto g. 40B, Verslo centras „Dvyniai“, LT-03163 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:
Ūminio pankreatito eigos sunkumo įvertinimo būdas

(57) Referatas:

Šis išradimas atskleidžia diagnostinį kriterijų DC, leidžiantį greitai numatyti ūminio pankreatito sunkumo eigą pacientams pirmosiomis ligos dienomis (1, 2 arba 3 dieną). Ankstyvos prognozės esmė yra apskaičiuota skaitinė diagnostinio kriterijaus DC vertė, parodanti, ar pacientui gresia sunki ūminio pankreatito eiga, turinti ženklų mirtinos baigties tikimybę. Diagnostinis kriterijus DC yra šlapimo karbamido $C_{urine\ urea}$ ir kraujo karbamido $C_{serum\ urea}$ santykio vertė. Jeigu šis diagnostinio kriterijaus DC santykis yra reikšmių intervale nuo 60 iki 15, tokiu atveju, prognozuojama lengva ar vidutinio sunkumo ūminio pankreatito eiga. Jeigu DC santykio reikšmė yra gauta mažesnė nei 15, tuomet tokiame pacientui prognozuojama ūminio pankreatito sunki arba net mirtina baigtis. Šis diagnostinis kriterijus DC – tai greita ir paprasta priemonė, medikams padedanti ūminio pankreatito ankstyvoje stadijoje nustatyti tuos pacientus, kuriems gresia sunki eiga ar mirtina baigtis, ir atitinkamai parinkti tokiame ūminio pankreatito atveju individualią gydymo taktiką.

IŠRADIMO SRITIS

Išradimas yra susijęs su ūminio pankreatito eigos prognozavimu, naudojant biologinius žymenis šlapime. Jame atskleidžiamas AP eigos sunkumo įvertinimo metodas, naudojant specialų vertinimo kriterijų, pagal kurį galima įvertinti ūminio pankreatito (*angl. acute pancreatitis, AP*) eigos sunkumą, nustačius šlapimo karbamido ir kraujo karbamido koncentracijų santykį.

TECHNIKOS LYGIS

Ūminis pankreatitas (*angl. Acute pancreatitis AP*) yra viena labiausiai paplitusių virškinamojo trakto ligų, kurią lydi didelė emocinė, fizinė ir finansinė našta. AP sukelia staigią kasos ląstelių mirtį, o agresyvūs kasos fermentai pažeidžia pačią kasą ir patenka į kraują, paveikdami ne tik kasą, bet ir visą organizmą. Pavyzdžiui, pažeistos kraujagyslių sienelės gali sukelti kraujavimą. Ūminį pankreatitą lydinčios organų pažaidos gali sukelti pacientui ne tik sunkias komplikacijas, bet ir mirtiną baigtį. Faktiškai, AP sąsaja su pacientų sergamumu ir jų mirtingumu siekiančiu 20%, priklauso nuo AP eigos sunkumo. Siekiant išvengti mirtinų baigčių (*angl. lethal outcome, LO*) ir komplikacijų dėl sunkios (*severe, S*) AP eigos būtina laiku diagnozuoti, prognozuoti eigą ir taikyti atitinkamą gydymą. Šiuo metu AP (Harrison) sunkumui nustatyti naudojami Atlantos klinikiniai kriterijai ir originalūs Ransono kriterijai. Šios klasifikacijos apibrėžia 3 AP sunkumo laipsnius: lengvą (*angl. mild, M*); vidutinio sunkumo (*angl. moderately severe, MS*) ir sunkų (*angl. severe, S*) AP, kur lygio nustatymas pagrįstas nuolatinio organų nepakankamumo ir vietinių bei sisteminių komplikacijų buvimu ir (arba) nebuvimu [1]. Įprastai, AP diagnozuojamas praėjus 3-7 dienoms nuo simptomų atsiradimo. Ši diagnozė atliekama remiantis ne tik kraujo tyrimu ir klinikiniais duomenimis, bet ir radiologine charakteristika, o eiga dar patvirtinama ir kompiuterine tomografija. Tačiau per šį laikotarpį jau gali būti įsigalėjusi vėlyvoji AP stadija, sukėlus ne tik sudėtingas komplikacijas, bet ir mirtiną baigtį (LO). Tuo tarpu toks metodas naudojamas klinikinėje praktikoje, nes nėra paprastų, greitų testų, leidžiančių numatyti AP eigos sunkumą. Greita ir ankstyva sunkios AP eigos prognozė leistų pasirinkti suplanuotą tinkamą terapiją ir išvengti rimtų ligos komplikacijų ar net mirties.

Šiuolaikinėje literatūroje yra aprašyta keletas AP diagnostikos priemonių,

tačiau beveik visos jos remiasi tyrimais atliekamais vėlyvose AP stadijose, kai organuose jau atsiranda komplikacijos. Rusijos Federacijos patentiniame dokumente RU0002508549 aprašytas ūminį pankreatitą lydinčio absceso susidarymo trukmės prognozavimo metodas. Jis pasižymi prognozės tikslumu, tačiau, kadangi juo yra tiriamas jau absceso susidarymas, todėl šis metodas nebetinka ankstyvai AP eigos prognozei. Metodas sudėtingas, nes apima ūminio pankreatito sekvestracijos fazę, apimančią periferinio veninio kraujo DNR atkūrimą, +250 A/G Ltα polimorfizmo analizę, o stebint +250 GG arba +250 AG Ltα genotipus, ankstyvo absceso susidarymo riziką, lydinčią ūminio pankreatito sekvestracijos fazę [2].

Kitame patentiniame dokumente RU02338195 aprašomas ūminio pankreatito palankios ar nepalankios išeities. Jis gali būti naudojamas ūminio pankreatito baigčiai prognozuoti. Metodas realizuojamas sekančia eiga. Patekęs į ligoninę, pacientas tiriamas dėl askorbato kiekio kraujo serume. Jeigu šis kiekis didesnis nei $0,94 \pm 0,09$ mmol/l, tokiu atveju AP išeities prognozė yra laikoma palankia. Mažesnis nei $0,45 \pm 0,06$ mmol/l kiekis rodo nepalankią (letalinę) AP išeities prognozę. Tačiau, šis metodas gerai neprognozuoja AP eigos, o taip pat, tarpinė askorbato kiekio vertė (intervale 0,45-0,94) rodo neaiškią prognozę [3].

Dar viename patentiniame dokumente RU0002470309 aprašytas ūminio pankreatito prognozavimo metodas, kuris gali būti taikomas kaip vienas iš diagnostinių kriterijų vertinant ūminiu pankreatitu sergančių pacientų sunkumo laipsnį ir prognozę. Metodas paremtas eritrocitų lipidų sudėties indekso chaotropiškumo iš bendro lipidų kiekio nustatymu pagal formulę, kurioje turi būti įvertinti sekantys parametrai: CI - chaotropiškumo indeksas, vienetai LPL - lizofosfolipidų kiekis iš bendro lipidų kiekio, %; FFA - išraiška laisvųjų riebalinių rūgščių iš bendro lipidų kiekio, %; TPL - fosfolipidai esantys bendrame lipidų turinyje, %. Chaotropiškumo vertės indeksas žemesnis nei 1,7 atitinka normą, nuo 1,8 iki 2,5 ir yra indikatorius ūminio edeminio pankreatito su besimptomine ligos eiga, nuo 2,6 iki 4,4 - ūminis destruktivus pankreatitas su progresuojančia eiga. Išradimas suteikia galimybę padidinti ankstyvą diagnozės tikslumą ūminio pankreatito ligos eigos nustatymui [4].

Dar viename Rusijos Federacijos patentiniame dokumente RU0002679123 aprašomas sunkaus ūminio nekrozuojančio pankreatito prognozavimo metodas, kaip priemonė nuspėti sunkų ūminį nekrozinį pankreatitą, nustatant žymens koncentraciją veninio kraujo serume. Metodas pasižymi tuo, kad transtiretino koncentracija veninio

kraujo serume yra naudojamas kaip žymuo. Veninis kraujas imamas 5-7-tą dieną nuo ligos pasirodymo momento. Tada, pagal transtiretino koncentraciją veninio kraujo serume, prognozuojamas ligos tipas. Pagal transtiretino koncentracijos <14 mg/dl vertę, prognozuojama sunkaus ūminio nekrozuojančio pankreatito išsivystymas. Išradimas leidžia greitai ir tiksliai prognozuoti sunkų ūminį nekrozinį pankreatitą [5].

Europos patente EP0258995B1 aprašytas sudėtingas ir brangus AP ligos diagnozavimo, sunkumo prognozavimo ir monitoringo metodas, atliekant imunologinį kasos zimogenų aktyvinimo laisvųjų peptidų tyrimą. Kasos liga gali būti diagnozuojama panaudojant paciento biologinius skysčius, t.y. serumą ar šlapimą, tiriant kasos zimogenų aktyvacijos peptidus specifiskai gautus po aktyvacijos proteolizės metu, (PAP), pvz. peptidus turinčius D4K seką, kuomet lizinas yra karboksi grupės gale. Kai yra atliekamas PAP, tai suteikia galimybę atskirti nekrotizuojantį ūminį pankreatitą nuo edeminio ūminio pankreatito, padeda diagnozuoti lėtinį pankreatitą esant ligos paūmėjimams ir monitoruoja ligos sunkumo progresą. Taip pat, aprašyti antikūnai, pasižymintys specifiskumu kasos aktyvinimo peptidams, taip pat tokie peptidai ir antikūnai, kurie yra paženklinami žymenimis ir (arba) imobilizuoti ant kietų matricų, ir jų naudojimas diagnostinių tyrimų rinkiniuose [6].

Rusijos Federacijos patentinis dokumentas RU0002485509 atskleidžia ūminio destruktinio pankreatito klinikinės eigos prognozavimo metodą. Šis metodas įgyvendinamas nesudėtingai, tačiau jį įvykdyti užtrunka daug laiko. Metodo esmė: nustatomas trombocitų skaičius ir vidutinis tūris; cirkuliuojančių trombocitų funkcinė masė apskaičiuojama kaip trombocitų skaičiaus ir vidutinio trombocitų tūrio sandauga. Pagal cirkuliuojančių trombocitų funkcinės masės padidėjimą per mažiausiai 10 dienų, numatoma palanki klinikinė ligos eiga, o trombocitų masės sumažėjimas reiškia nepalankią klinikinę eigą [7].

Kasos liga gali būti diagnozuojama naudojant paciento biologinius skysčius tokius kaip serumas ar šlapimas, juose tiriant kasos aktyvuotus peptidus (PAP) išsiskiriančius iš zimogenų dėl proteolitinės aktyvacijos. Ypatingai naudingi yra peptidai turintys C-gale D.sub.4K seką. JAV patentinis dokumentas US5356781 [8] aprašo zimogeno aktyvinimo peptidų (ZAP) metodą, kuris remiasi polikloniniais arba monokloniniais antikūniais, kurie yra generuojami ir yra specifiski PAP C-gale, ko pasekoje testai detektuoja tik laisvus PAP, o ne giminingą zimogeną. Taip pat apibūdinami yra antikūniai ir peptidai pažymėti specifiniais žymenimis ir/arba yra

imobilizuoti ant tvirto pagrindo ir jų nauda diagnostiniuose rinkiniuose ir laboratoriniuose bandymuose. Esant kasos ligoms, diagnostiniai testai gali padėti atskirti: nekrotizuojantį nuo edeminio ūminio pankreatito bei ūminio pankreatito ligos sunkumui nusakyti, monitoruoti bei diagnozuoti lėtinį pankreatitą esant ligos paūmėjimams. Testai aprašantys laisvus aktyvacijos peptidus iš zimogenų profosfolipazės A, prokolipazės ir proelastazės, gali būti taikomi ne tik kasos ligoms, kur šių zimogenų aktyvacija, panaudoja tą pačią homologinę seką aktyvuojant peptido C-galo regioną bei randami pankreatiniai izofermentai formuojantys ligos molekulinę patologiją.

Šiuo metu klinikinėje praktikoje nepakanka paprastų ir neinvazinių tyrimų, kurie tikėtų AP ankstyvajai diagnozei ar prognozei nustatyti. Todėl neskausmingos diagnostikos priemonės ir būdai, tokie, kaip šiame išradime atskleistas AP eigos vertinimo būdas ir diagnostinis kriterijus (DC), yra perspektyvūs klinikinėje praktikoje.

IŠRADIMO ESMĖ

Šiuo išradimu sukurtas metodas ir diagnostinis kriterijus (DC), leidžiantys numatyti ūminio pankreatito eigos sunkumą po hospitalizavimo pirmosiomis ligos dienomis. Diagnostinio kriterijaus (DC) esmė yra šlapimo karbamido ir kraujo karbamido koncentracijų santykio reikšmė, kuri yra AP eigos sunkumo rodiklis. Hospitalizuotam pacientui nustatomos karbamido molinės koncentracijos (C(mol/l)) tiek kraujo serume, tiek šlapime. Tyrimų rezultatų duomenys aiškiai parodė, jog jei minėtas koncentracijų santykis (DC) $C_{urine\ urea} / C_{serum\ urea}$ įgyja reikšmę iš intervalo tarp 60 ir 15, tokiu atveju, tikėtina lengva ar vidutinio sunkumo (M/MS) AP eiga. O jei šio diagnostinio kriterijaus reikšmė gauta mažesnė nei 15, tai tokiam pacientui prognozuojama sunki (severe, S) AP eiga, galinti baigtis ir mirtimi (*lethal outcome, LO*). Šis DC kriterijus yra greita ir efektyvi priemonė medikams, identifikuojant AP ligonius, kuriems gresia sunki (S) AP eiga ir kiekvienam tokiam ligos atvejui bei pacientui parinkti individualią gydymo taktiką.

Šis diagnostinio kriterijaus (DC) išradimas leidžia greitai, pirmosiomis ligos dienomis (1, 2 arba 3 dieną) AP pacientams numatyti sunkumo eigą. Ankstyvos prognozės esmė yra apskaičiuota skaitinė diagnostinio kriterijaus (DC) vertė, parodanti, ar pacientui gresia sunki (S) AP eiga (turinti ženkliai mirtinos baigties

tikimybę). Kadangi diagnostinis kriterijus (DC) yra nustatomas naudojant šlapimo mėginius ir įprastai atliekamų laboratorinių kraujo serumo tyrimo duomenis, todėl šis įvertinimo metodas priskirtinas prie metodų kuriuos atliekant pacientas patiria mažiau skausmo.

TRUMPAS BRĖŽINIŲ APRAŠYMAS

Išradimo esminės savybės yra apibrėžiamos apibrėžties punktuose. Tuo tarpu, išradimas geriausiai išaiškintas ir suprantamas pagal išsamų išradimo aprašymą, kuriame atskleisti tinkamiausi išradimo įgyvendinimo variantai, pateikti išradimo apimties neribojančiais pavyzdžiais, kartu su pridedamais brėžiniais:

1 pav. atvaizduoja pastovios srovės (I) priklausomybę, kaip biojutiklio atsaką į karbamido koncentracijas: $E = 0$ V pagal Ag/AgCl; PBS (20 mM; pH 7,2).

2 pav. atvaizduoja koreliaciją tarp karbamido koncentracijos serume, nustatytos naudojant amperometrinį biojutiklį ir karbamido koncentracijos serume, nustatytos VUL Santaros klinikų Biochemijos laboratorijoje: $E = 0$ V pagal Ag/AgCl;

3 pav. atvaizduoja karbamido koncentracijų santykio $C_{\text{urine urea}}/C_{\text{serum urea}}$ ryšį su ūminio pankreatito eigos sunkumo lygiu: kontrolinė grupė (C), lengvos eigos grupė (*mild, M*), vidutinio sunkumo eigos grupė (*moderate severity, MS*), sunkios eigos grupė (*severe, S*) ir grupė su letalinėmis išeitimis (*lethal outcome, LO*) grupės. Intarpe pateikta grupių vidurkinių reikšmių su standartinėmis paklaidomis priklausomybė nuo ūminio pankreatito eigos sunkumo. Slenkstinė DC reikšmė S/LO grupei pažymėta punktyrine linija.

Tinkamiausi išradimo įgyvendinimo variantai aprašyti toliau, su nuoroda į brėžinius. Kiekviename brėžinyje naudojama ta pati to paties arba lygiavertio elemento numeracija.

IŠSAMUS IŠRADIMO APRAŠYMAS

Blood Urea Nitrogen (BUN) testas yra vienas iš įprastų laboratorinių tyrimų, atliekamų identifikuojant sergantį pankreatitu. Ankstesniuose tyrimuose buvo parodyta, jog serijinis BUN matavimas yra reikšmingas prognozuojant mirtingumą dėl AP [9]. Tačiau, BUN testas daugiausia atspindi intravaskuliarinio tūrio būklę ir yra

inkstų funkcijos sutrikimo rodiklis. Šiame išradime, pirmą kartą pademonstruota, jog AP eigos sunkumo lygis priklauso nuo karbamido koncentracijos šlapime. Iki šiol priklausomybė tarp AP ir karbamido kiekio šlapime nebuvo atskleista. Be to, šlapimo karbamido ir kraujo serumo karbamido koncentracijų santykis leidžia tiksliai atskirti lengvas/vidutinio sunkumo ir sunkias AP pacientų grupes, per pirmąsias valandas po priėmimo (hospitalizavimo).

Hospitalizuotam pacientui serumo ir šlapimo mėginiuose nustatoma molinė karbamido koncentracija (C (mol/l)). Jei šlapimo karbamido ir serumo karbamido koncentracijų santykio ($C_{\text{urine urea}}/C_{\text{serum urea}}$) skaitinė reikšmė gaunama intervale nuo 60 iki 15, tuomet pacientui prognozuojama lengvo/vidutinio sunkumo (M/MS) AP eiga. Jeigu šio kriterijaus (DC) skaitinė reikšmė yra mažesnė nei 15, tai tokiam pacientui prognozuojama sunki (S) AP eiga.

Skaitinės DC kriterijaus reikšmės buvo paskaičiuotos, naudojant šlapimo ir kraujo serumo mėginius paimtus iš 16 kontrolinių asmenų ir 136 AP pacientų Vilniaus Universiteto ligoninės (VUL) Santaros klinikų Pilvo chirurgijos skyriuje.

Karbamido koncentracija kraujo serume ($C_{\text{serum urea}}$) buvo nustatyta VUL Santaros klinikų biochemijos laboratorijoje, analizatoriumi ARCHITECT plus ic 8200 (iš Abbott, Abbott Park, Illinois, JAV).

Šlapimo karbamido koncentracija ($C_{\text{urine urea}}$) buvo nustatyta Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biochemijos instituto Bioanalizės skyriuje sukurtu karbamido biojutikliu. Biojutiklio veikimo principas, tikslumas ir pritaikomumas aprašyti publikacijoje [10]. Biojutiklis buvo įmontuotas į elektrocheminę celę (1,65 ml talpos), kurioje veikia pagalbinis platinos elektrodas, palyginamasis prisotinto Ag/AgCl elektrodas ir darbinis elektrodas (biojutiklis). Elektrocheminė celė, naudojant automatinę pipetę (iš Eppendorf research, Hamburg, Germany), buvo užpildyta 1,65 ml 20 mM natrio fosfato buferinio tirpalu (PBS)(pH = 7,2), kuriame yra 100 mM KCl.

Karbamido koncentracija šlapime ($C_{\text{urine urea}}$) buvo nustatyta pagal tiesinę kalibravimo kreivės dalį, pavaizduotą 1 paveiksle. Kalibravimo kreivė gauta eksperimentiniu būdu, į elektrocheminę celę pridedant 0,125; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5 ir 2,5 mM karbamido PBS.

Prieš atliekant karbamido šlapime ($C_{\text{urine urea}}$) tyrimus, šlapimo mėginiai 10 kartų praskiedžiami PBS tirpalu, o po to į elektrocheminę celę pridedama po 50 μ l

šlapimo mėginio. Biojutiklis, po mėginio, kuriame yra karbamido, pridėjimo į elektrocheminę celę, rodo nuo substrato priklausomą anodinį atsaką. Atsakas buvo matuojamas kaip elektros srovės skirtumas tarp pastovios ir foninės srovės. Elektrodo srovės kitimo laike atsakas, kai darbinis potencialas yra 0V palyginamojo Ag/AgCl atžvilgiu, buvo užregistruotas naudojant potenciostatą/galvanostatą Advanced Electrochemical System PARSTAT 2273 (iš Princeton Applied Research, Oak Ridge, JAV).

Biojutiklio analitinis tikslumas buvo patvirtintas biojutikliu nustatčius karbamido koncentracijas ($C_{\text{urea (serum)}}$), ir jų vertes palyginus su vertėmis nustatytomis patvirtintu metodu. Biojutikliu gautos $C_{\text{urea (serum)}}$ reikšmės buvo palygintos su VUL Santaros klinikų biochemijos laboratorijoje nustatytais kiekiais, cheminės sudėties analizatoriumi ARCHITECT plus ic8200 (iš Abbott, Abbott Park, Illinois, JAV). Abiem būdais gauti matavimo duomenys pateikti 2 paveiksle.

Ryšys tarp duomenų, gautų dviem metodais 2 paveiksle, yra tiesinis, o koreliacijos koeficientas ($r_{xy} = 0,9945$) rodo gerą atitikimą tarp biojutikliu nustatytų karbamido koncentracijų ir VUL Santaros klinikų biochemijos laboratorijoje atliktų matavimų.

Gautas koreliacijos koeficientas rodo, kad rezultatai, nustatyti naudojant amperometrinį biojutiklį, yra šiek tiek mažesni nei VUL Santaros klinikų Biochemijos laboratorijoje gauti analizės rezultatai. Tačiau, šie palyginimai tik patvirtina, kad biosensorius nematuoja papildomų medžiagų, o generuoja teisingą ir tikslų atsaką į serume esantį karbamidą.

Siekiant įvertinti DC kriterijaus patikimumą, vertinta grupė (kohorta), sudaryta iš kontrolinės (C), lengvos (M), vidutinio sunkumo (MS) ir sunkios (S) AP eigos pacientų. Iš sunkios eigos (S) pacientų, septyni iš jų vėliau turėjo mirtinas baigtis (LO). Pagal bendrus duomenis iš kontrolinės grupės ir pacientų, paguldytų į ligoninę su AP diagnoze per pirmąsias 78 valandas, $C_{\text{urine urea}}/C_{\text{serum urea}}$ diagnostinis kriterijus (DC) tirtas kaip AP eigos sunkumo funkcija.

OriginPro 8.5 programinė įranga buvo naudojama atlikti statistinei duomenų analizei ANOVA su Tukey kriterijumi, taip siekiant įvertinti $C_{\text{urine urea}}/C_{\text{serum urea}}$ (pagal nustatytus kiekius šlapime ir serume) priklausomybę su AP eigos sunkumu. Gauta $C_{\text{urine urea}}/C_{\text{serum urea}}$ priklausomybė nuo AP eigos sunkumo pavaizduota 3 paveiksle.

Remiantis šios analizės rezultatais, padaryta išvada, kad jei ($C_{urine\ urea}/C_{serum\ urea}$) skaitinė reikšmė yra nuo 60 iki 16, šis pacientas patirs lengvą ar vidutinio sunkumo AP eigą, o jei kriterijaus reikšmė mažesnė nei 15, šiam pacientui numatoma sunki AP eiga.

Grupių palyginimas vienfaktorine dispersine analize (ANOVA) pateiktas 1 lentelėje.

1 lentelė. ANOVA palyginimo rezultatai.

	Imtis	Imties vidurkis	Standartinis nuokrypis	Standartinė paklaida (SE) nuo vidurkio	
C	16	57,25	31,43	7,86	
M/MS	80	36,90	24,80	2,77	
S/LO	50	9,56	10,77	1,52	
	Laisvės laipsnių skaičius (DF)	Kvadratų suma	Vidutinis kvadratas	F vertė	Tikimybė(Prob)>F
Modelis	2	36575,98	18287,99	37,85	6,42E-14
Paklaida	143	69094,53	483,18		
Viso	145	105670,5			
ANOVA grafikas	ANOVA grafikas	ANOVA grafikas	ANOVA grafikas		
Rodiklis	Vidurkių skirtumas (MeanDiff)	Vidurkio standartinė paklaida (SEM)	p-reikšmė vidurkiams (Sig)		
Tukey testo vidurkių skirtumas	Tukey testo vidurkių skirtumas	Tukey testo vidurkių skirtumas	Tukey testo vidurkių skirtumas		
M/MS - C	-20,35	6,02	1		
S/LO - C	-47,69	6,31	1		
S/LO - M/MS	-27,34	3,96	1		

Kaip matyti 3 paveiksle ir 1 lentelėje, santykio $C_{\text{urine urea}}/C_{\text{serum urea}}$ vidurkis susijęs su AP eiga. Jis mažėja tiesiškai, didėjant AP eigos sunkumui (3 paveikslo intarpas). Gautos statistikos ANOVA patikimumo lygmens „p“ vertė nustatyta $6,42 \cdot 10^{-14}$ (1 lentelė). Parametro „p“ reikšmė mažesnė nei pasirinktas reikšmingumo lygmuo 0,01, tai rodo, kad grupių vidurkiai statistiškai reikšmingai skiriasi. Be to, daugkartiniam grupių palyginimui buvo naudojamas Tukey testas. Nustatyta, kad pacientai, sergantys sunkia AP eiga (S/LO), turėjo žymiai mažesnes $C_{\text{urine urea}}/C_{\text{serum urea}}$ reikšmes, palyginti su kontroline grupe (C) ir grupe pacientų, sergančių lengva ar vidutinio sunkumo AP eiga (M/MS) (1 lentelė, Tukey testas). Pacientų, kurie sirgo lengva ar vidutinio sunkumo AP eiga, $C_{\text{urine urea}}/C_{\text{serum urea}}$ vertės taip pat ženkliai skyrėsi, palyginus su C grupe (1 lentelė, Tukey testas). Duomenys aiškiai parodė, jei $C_{\text{urine urea}}/C_{\text{serum urea}}$ vertė yra nuo 60 iki 15, tuomet gali būti prognozuojama lengva ar vidutinio sunkumo (M/MS) AP eiga. Jei šio diagnostinio kriterijaus (DC) reikšmė mažesnė nei 15, tai tokiam pacientui turi būti prognozuojama sunki AP eiga (S), turinti ir mirtinos baigties (LO) tikimybę.

Medžiagos, naudotos sukurti karbamido biojutiklį: ureazė iš *Canavalia ensiformis* (E.C. 3.5.1.5.); Jaučio serumo albuminas, V frakcija; glutaraldehido tirpalas, I lygis, 25 % H_2O ; karbamidas, $\geq 99,0$ %; kalio chloridas (KCl), $\geq 99,0$ %; kalio dihidrofosfatas (KH_2PO_4), $\geq 98,0\%$; natrio hidrofosfatas (Na_2HPO_4), $\geq 99,0\%$; kalcio chloridas ($CaCl_2$), $\geq 93,0$ %; pusiau-pralaidi terileno membrana (storis 12 μm , porų skersmuo 0,4 μm), iš Jungtinio Branduolinių tyrimų instituto, Rusija; pagal levos Šakinytės daktaro disertacijos protokolą (VU Gyvybės mokslų centro Biochemijos institutas), iš natūralaus grafito susintetintas termiškai redukuotas grafeno oksidas (TRGO).

Praktinis įgyvendinimas (AP eigos įvertinimo būdo tinkamiausias įgyvendinimo variantas)

Paimami periferinio kraujo ir šlapimo mėginiai iš pankreatitu susirgusių pacientų, priėmimo per pirmąsias 78 valandas;

Nustatomos karbamido koncentracijos: serumo karbamido ($C_{\text{serum urea}}$, mol/l) naudojant cheminės sudėties analizatorių ARCHITECT plus ic8200 (Abbott, Abbott Park, Illinois, USA);

Šlapimo karbamido koncentracija ($C_{\text{urine urea}}$, mol/l) nustatoma karbamido

biojutikliu, kur

elektrocheminė celė pripildoma 1,65 ml natrio fosfato 20 mM buferinio tirpalo PBS, (pH = 7,2), kuriame yra 100 mM KCl,

sudaroma biojutiklio kalibravimo kreivė, naudojant kalibravimo etaloninius tirpalus (0,125; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5 ir 2,5 mM karbamido PBS);

šlapimo mėginys skiedžiamas 10 kartų PBS tirpalu,

50 µl mėginio pridedama į elektrocheminę celę,

biojutiklio srovės kitimo laike atsakas, kai darbinis potencialas yra 0 V, palyginamojo Ag/AgCl atžvilgiu, registruojamas naudojant potenciostatą/galvanostatą, tokį kaip Advanced Electrochemical System PARSTAT 2273 (Princeton Applied Research, Oak Ridge, USA),

šlapimo karbamido koncentracija, $C_{\text{urine urea}}$, mol/l, proporcinga biojutiklio atsakui, nustatoma naudojant kalibravimo kreivę;

Apskaičiuojamas diagnostinis kriterijus ($C_{\text{urine urea}}/C_{\text{serum urea}}$), padalijus $C_{\text{urine urea}}$ vertę iš vertės $C_{\text{serum urea}}$, nustatytą to paties paciento šlapimo ir kraujo mėginiuose minėtais 2 nustatymo metodais (arba kitais galimais metodais);

įvertinama diagnostinio kriterijaus DC reikšmė, kuri:

jei gauta intervale tarp 60 ir 15, AP eiga priskiriama lengvo arba vidutinio sunkumo AP eigai (M/MS),

jei gauta mažesnė nei 15, AP eiga priskiriama didelio sunkumo AP eigai (S).

LITERATŪROS SĄRAŠAS

[1] Sarr, M.G.; Banks, P.A.; Bollen, T.L.; Dervenis, C.; Gooszen, H.G.; Johnson, C.D.; Tsiotos, G.G.; Swaroop Vege, S. The New Revised Classification of Acute Pancreatitis 2012, *Surgical Clinics of North America* 2013, 93(3), 549-562; DOI: 10.1016/j.suc.2013.02.012.

[2] Parfenov, I.P.; Churnosov, M.I.; Belousov, V.A. 2014 02 27. Method for prediction of length of abscess formation accompanying acute pancreatitis. Russian Federation RU0002508549.

[3] Demin, D.B.; Tarasenko, V.S.; Shchetinin, N.A.; Nikonorov, A.A.; Afonina, S.N.; Pavlova, M.M.; Kornilov, S.A.; Basov, F.V. 2008 11 10. Prediction method of acute pancreatitis outcome. Russian Federation RU02338195.

[4] Vlasov, A.P.; Nachkina, E.I.; Grigor'eva, T.I.; Fedoseeva, T.A.; Vlasov, P.A.; Shibitov, V.A.; Bardina, I.V. 2021 12 20. Method of predicting acute pancreatitis. Russian Federation RU0002470309.

[5] Sivkov, O.G.; Lejderman, I.N.; Zajtsev, E.Y.; Sivkov, A.O.; Efanov, A.V.; Ponomareva, M.A. 2019 02 06. Method for predicting severe acute necrotizing pancreatitis. Russian Federation RU0002679123.

[6] Hermon-Taylor, J.; Austen, B.M. 1988 03 09. Diagnosis, severity prediction, and monitoring of disease by immunoassay of free activation peptides of pancreatic zymogens. European Patent Office EP0258995.

[7] Smolina, E.N.; Pridantseva, O.V.; Galkina, O.V.; Kadinskaja, M.I.; Cherednichenko, D.V. 2013 06 20. Method for prediction of clinical course of acute destructive pancreatitis. Russian Federation RU0002485509.

[8] Hermon-Taylor, J.; Austen, B.M. 1994 10 18. Zymogen activation peptides (zap) in the diagnosis of disease. United States of America US5356781.

[9] Wu, B.U.; Johannes, R.S.; Sun, X.; Conwell, D.L.; Banks, P.A. Early Changes in Blood Urea Nitrogen Predict Mortality in Acute Pancreatitis, *Gastroenterology* 2009, 137(1), 129-135; DOI: 10.1053/j.gastro.2009.03.056.

[10] Razumiene, J.; Gureviciene, V.; Sakinyte, I.; Rimsevicius, L.; Laurinavicius, V. The Synergy of Thermally Reduced Graphene Oxide in

Amperometric Urea Biosensor: Application for Medical Technologies, *Sensors* 2020, 20(16), 4496; doi:10.3390/s20164496.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Ūminio pankreatito AP eigos įvertinimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad

- pateiktuose paciento kraujo ir šlapimo mėginiuose matuojamos karbamido koncentracijos, mol/l,

- apskaičiuojamas karbamido koncentracijų, mol/l, šlapimo mėginyje ir kraujo mėginyje, santykis $C_{\text{urine urea}} / C_{\text{serum urea}}$,

- šio santykio vertė palyginama su vertinimo kriterijaus DC verte, kurios atžvilgiu suskaičiuota $C_{\text{urine urea}} / C_{\text{serum urea}}$ vertė priskiriama lengvo/vidutinio sunkumo AP eigos arba į sunkios AP eigos klases,

kur vertinimo kriterijaus DC vertė, suformuota iš masyvo, apimančio ankstesnių AP atvejų statistinius duomenis, aprašančius kiekvienam ankstesniam AP atvejui priklausomybę tarp jame įvertintos santykio $C_{\text{urine urea}} / C_{\text{serum urea}}$ vertės, ir vėliau įvykusios-konstatuotos to AP atvejo eigos - lengvos/vidutinio sunkumo, arba sunkios.

2. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad šlapimo mėginyje molinė karbamido koncentracija, mol/l, yra nustatoma amperometriniu karbamido biojutikliu, turinčiu selektyvią fermentinę membraną, apimančiu elektrocheminę celę, pageidautina 1,65 ml tūrio, su pagalbiniu platinos elektrodu, palyginamuoju sotaus Ag/AgCl elektrodu, ir darbinio elektrodu, funkcionuojančiu kaip biojutiklis ir generuojančiu anodinį atsaką

3. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad molinė karbamido koncentracija, mol/l, kraujo serume yra nustatoma cheminės sudėties analizatoriumi, tokiu kaip ARCHITECT plus ic8200.

4. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad tinkamiausias praktinis būdo įgyvendinimas apima šiuos žingsnius:

- a) per pirmąsias 78 valandas pateikiami periferinio kraujo ir šlapimo mėginiai iš pankreatitu susirgusių pacientų;

b) nustatomos karbamido koncentracijos: serumo karbamido $C_{\text{serum urea}}$, mol/l, ir šlapimo karbamido $C_{\text{urine urea}}$, mol/l;

c) šlapimo karbamido koncentracija $C_{\text{urine urea}}$, mol/l nustatoma paruoštu darbui amperometriniu karbamido biojutikliu,

d) apskaičiuojama šio AP atvejo karbamido koncentracijų santykio $C_{\text{urine urea}} / C_{\text{serum urea}}$ vertė, padalijus $C_{\text{urine urea}}$ vertę iš $C_{\text{serum urea}}$ vertės, kur šios vertės buvo paciento šlapimo ir kraujo mėginiuose;

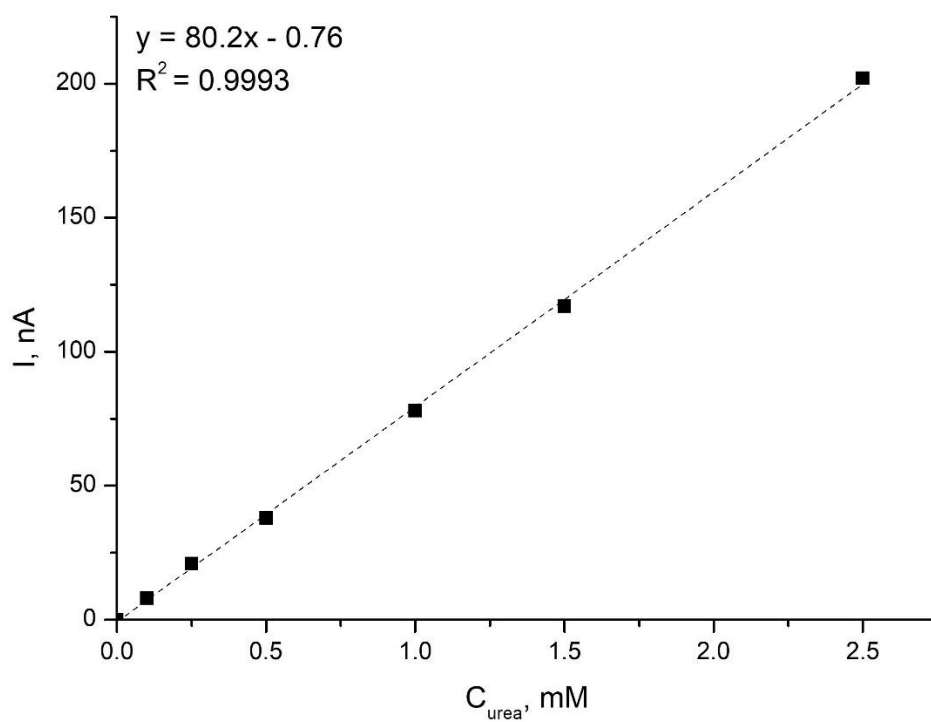
e) santykio $C_{\text{urine urea}} / C_{\text{serum urea}}$ vertė palyginama su vertinimo kriterijaus DC verte, ir priskiriama vienai iš mažiausiai šių klasių, kur:

- jeigu santykio $C_{\text{urine urea}} / C_{\text{serum urea}}$ vertė, gauta didesnė už vertinimo kriterijaus DC vertę, tai šis AP atvejis priskiriamas lengvo/vidutinio sunkumo AP eigai,
- jeigu santykio $C_{\text{urine urea}} / C_{\text{serum urea}}$ vertė gauta mažesnė už vertinimo kriterijaus DC vertę, tai šis AP atvejis priskiriamas sunkiai/mirtinai AP eigai.

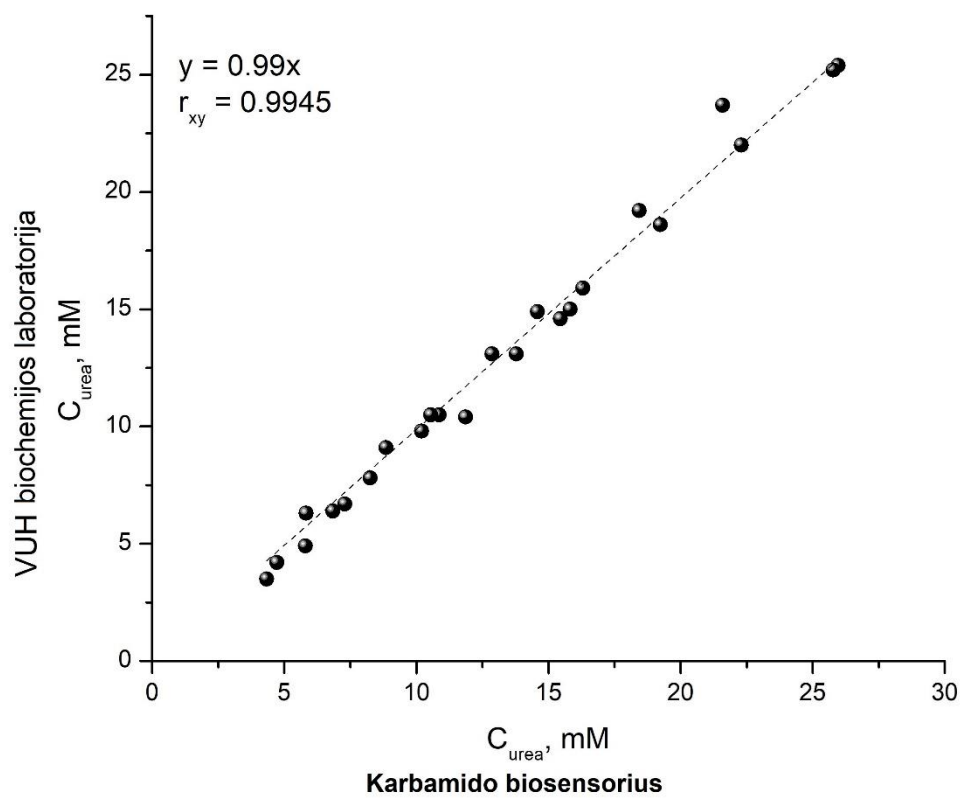
5. Būdas pagal 1 ir 4 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad vertinimo kriterijaus DC vertė yra lygi 15.

6. Būdas pagal 4 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad amperometrinis karbamido biojutiklis darbui paruošiamas šia operacijų seka:

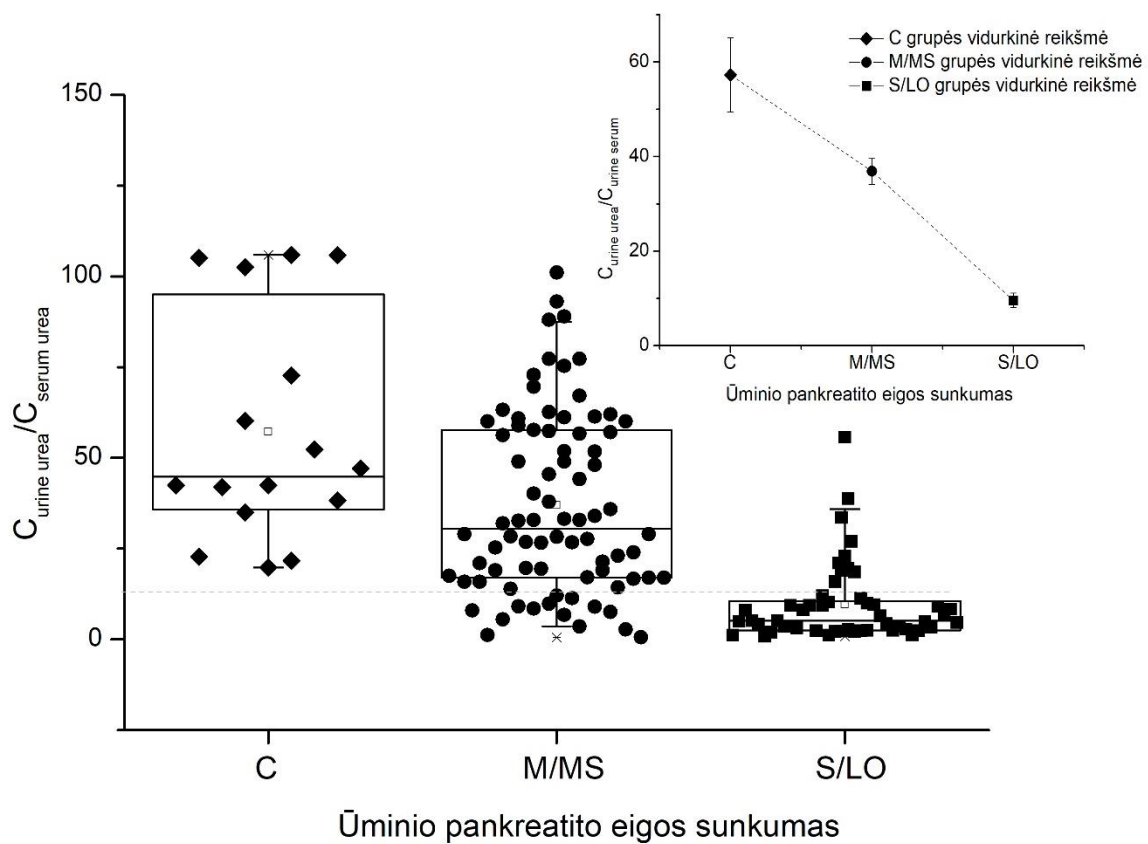
- o elektrocheminė celė pripildoma 1,65 ml natrio fosfato 20 mM buferinio tirpalo PBS (pH = 7,2), kuriame yra 100 mM KCl,
- o sudaroma biojutiklio kalibravimo kreivė, naudojant kalibravimo etaloninius tirpalus (0,125; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5 ir 2,5 mM karbamido PBS);
- o šlapimo mėginys skiedžiamas 10 kartų PBS tirpalu,
- o 50 µl mėginių pridedama į elektrocheminę celę,
- o elektrodo srovės kitimo laike atsakas, kai darbinis potencialas yra 0 V, palyginamojo Ag/AgCl atžvilgiu, registruojamas naudojant potenciostatą/galvanostatą, tokį kaip Advanced Electrochemical System PARSTAT 2273,
- o šlapimo karbamido koncentracija, $C_{\text{urine urea}}$, mol/l, proporcinga biojutiklio atsakui, nustatoma naudojant kalibravimo kreivę.



1 pav.



2 pav.



3 pav.