



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **104090** (13) **C2**
(51) МПК (2013.01)
A61B 5/00
G01N 33/50 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: а 2012 12454	(72) Винахідник(и): Березенко Валентина Сергіївна (UA), Мостовенко Раїса Василівна (UA), Диба Марина Борисівна (UA), Філатова Олена Борисівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 31.10.2012	(73) Власник(и): ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ПЕДІАТРІЇ, АКУШЕРСТВА І ГІНЕКОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ", вул. Платона Майбороди, 8, м. Київ, 04050 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 25.12.2013	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: Окислительная модификация белков / Е. Дубинина, В. Шугалей // Успехи совр. биологии. – 1993. – Т. 113, вып. 1. – С. 71-81 Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения / Е.Е. Дубинина, С.О. Бурмистров, Д.А. Ходов, И.Г. Поротов // Вопросы мед. химии. – 1995. – № 1. – С. 24-26 Окислювальна модифікація білків як один з патогенетичних механізмів розвитку вірусних гепатитів / О.В. Мироник, .Ф. Мецишен, А.М. Сокол // Вісник наук. досліджень. – 1999. – 1. – С. 89-90 Порівняння інтенсивності окиснювальної модифікації білків у хворих на гострі гепатити В та С / Мироник О.В. // Буковинський мед. вісник. – 2001. – №2. – С. 118-120 Окислительный стресс у больных хроническим гепатитом С / Л.В.Мороз, Е.Ф.Шкондина, В.М.Дудник, С.М.Куляс // Междунар. мед. журнал. – 2008. – №1. – С. 84-87 UA 3920 U, 15.12.2004 UA 22383 U, 25.04.2007
(41) Публікація відомостей про заявку: 10.06.2013, Бюл.№ 11	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.12.2013, Бюл.№ 24	

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ ПРОГРЕСУВАННЯ ХРОНІЧНОГО ВІРУСНОГО ГЕПАТИТУ С У ДІТЕЙ**(57) Реферат:**

Винахід належить до галузі медицини, а саме до дитячої гастроентерології та гематології, і може бути використаний для діагностики прогресування хронічного вірусного гепатиту С у дітей. Спосіб діагностики прогресуючого перебігу хронічного вірусного гепатиту С у дітей, за винаходом, полягає у тому, що досліджують кількість 2,4-кетондинітрофенілгідразонів (2,4-

UA 104090 C2

КДНФГ) в сироватці крові до ініціації процесів окислення білків (спонтанну окисну модифікацію білків) та після ініціації процесів окислення білків (індуковану окисну модифікацію білків), після чого розраховують показник резервно-адаптаційних можливостей за формулою:

спонтанна окисна модифікація білків $\times 100$ / індукована окисна модифікація білків,
причому при рівні показника резервно-адаптаційних можливостей нижче за 45 % діагностують наявність високого ризику прогресуючого перебігу хвороби у хворих на хронічний гепатит С.

Винахід належить до галузі медицини, а саме до дитячої гастроентерології та гематології, і може бути використаний для діагностики прогресування хронічного вірусного гепатиту С у дітей.

Основним патогенетичним механізмом прогресування хронічних вірусних гепатитів є фіброзування тканини печінки. Серед найбільш вагомих індукторів фіброзу печінки виділяють оксидативний стрес. Вільні радикали, які утворюються в результаті оксидативного ураження тканини стимулюють процеси фіброгенезу в гепатоцитах.

Пункційна біопсія печінки й до теперішнього часу залишається "золотим стандартом" діагностики в гепатології. Біопсія печінки дозволяє визначити ступінь активності запалення, стадію фіброзу при різних захворюваннях печінки. В багатьох випадках саме цей спосіб дослідження є вирішальним в діагностиці та вибору оптимальної тактики ведення хворого (Павлов Ч.С., Івашкин В.Т. Биопсия печени: Методология и практика сегодня. Росс. Журн. гастроэнтерол. гепатол., колопроктол., 2006, 4, 65-78).

В той же час даний метод має ряд обмежень, оскільки проведення пункційної біопсії потребує спеціальної підготовки та перебування в умовах стаціонару, окрім того у 0,5 % хворих можуть виникати ускладнення. В тому числі й такі, що загрожують життю пацієнта (Сюткин В.Е., Милехин А.П., Трибунов Ю.П. и др. Возможности пункционной биопсии при хронических диффузных заболеваниях печени. Рос. мед. журнал, 2002, 1, 28-31). Значним фактором, який лімітує широке використання методу є суб'єктивність оцінки морфологічних змін, особливо при дослідженні невеликого за розміром зразка тканини печінки. Розміри біопсійного матеріалу повинні бути не меншими за 2,0-0,1 см, а кількість портальних трактів - не менше 4-5 (Knodell R.G., Ishak K.G., Black W.S., et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. Hepatology, 1981, 1, 431-435).

Недоліки, які пов'язані з суб'єктивною оцінкою біопсії, можна зменшити при використанні способів напівкількісної оцінки, імуногістохімічних досліджень. Однак і вони не в повній мірі задовольняють лікарів.

Тому на сьогоднішній день в гепатології активно розробляються альтернативні біопсії способи діагностики стану печінки. Для оцінки ступеня фіброзу печінки використовують прямі та непрямі серологічні методи. Серологічні неінвазивні методи оцінки фіброзу печінки використовують у хворих, у яких проведення біопсії печінки протипоказано.

Відомий матеріал авторів: Patel K., Gordon S.C., Jacobson I. et al. Evaluation of a panel of noninvasive serum markers to differentiate mild from moderate to advanced liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. J. Hepatol., 2004, 41, 935-942.

Перевагою визначення сироваткових маркерів фіброзу печінки є можливість моніторингу тривалого динамічного спостереження за ступенем розвитку фіброзу. Недолік - дані способи не валідизовані для застосування в дитячій популяції.

Ультразвуковий спосіб дослідження також дозволяє оцінити виразність фібротичних змін в печінці, однак інформативність цього способу на ранніх стадіях фіброзу при проведенні рутинного дослідження є низькою, а використання високочастотного сканування у дітей з підвищеною масою тіла неінформативне. (Патент України на винахід №79297 "Спосіб діагностики хронічних дифузних захворювань печінки" Березенко В.С., Тарасюк Б.А., Лукянова І.С., Задорожна Т.Д., Іголкіна О.Д.)

Найбільш близьким до запропонованого способу є визначення вмісту білковозв'язаної фракції гідроксипроліну (БГП) в сироватці крові для оцінки фіброгенезу в печінці у дітей з хронічними гепатитами. (Березенко В.С., Тищенко В.К., Кудрей Ю.В. Біохімічні маркери склерогенезу печінки у дітей з хронічними вірусними гепатитами В та С" //Здоровье женщины. - 2005. - № 3. - С. 178-181.) Підвищений вміст БГП за даними авторів свідчить про інтенсивне колагеноутворення у дітей з ХГС. Недоліком даного методу є його низька чутливість, тому що рівень БГП також розглядають як маркер активності запального процесу в печінці.

В основу запропонованого способу діагностики прогресування хронічного вірусного гепатиту С у дітей поставлено задачу визначення показника резервно-адаптаційних можливостей протистояти оксидативному стресу з використанням біохімічного аналізу, що дозволить визначити ризик прогресування фіброзу печінки у дітей з хронічним гепатитом С, своєчасно розпочати адекватну медикаментозну терапію і рекомендувати більш часте динамічне спостереження за прогресуванням хвороби.

Поставлена задача способу діагностики прогресування хронічного гепатиту С у дітей вирішується шляхом визначення кількості 2,4 кетонденітрофенілгідразонів в сироватці крові, які реєструються на довжині хвилі 530 нм до ініціації окислювального стресу та після ініціації з розрахунком показника резервно-адаптаційних можливостей, причому показник резервно-

адаптаційних можливостей менший за 45 % вказує на наявність прогресуючого хронічного гепатиту С у дитини.

Причинно-наслідковий зв'язок полягає в наступному: серед найбільш вагомих індукторів фіброзу печінки виділяють оксидативний стрес. Вільні радикали, які утворюються в результаті оксидативного ураження тканини стимулюють процеси фіброгенезу в гепатоцитах. Вплив вільних радикалів на білки різного типу приводить до складних модифікацій в структурі білкової молекули і, відповідно, до зміни її фізико-хімічних і біологічних властивостей. Окисно модифіковані білки є відносно стабільними та ранніми показниками оксидативного стресу. За даними літератури наявність кетонденітрофенілгідразонів при спонтанній окисній модифікації білків (ОМБ) вказує на ступінь окислювальної деструкції білків, а збільшення їх кількості після ініціації процесів окислення білків (індукційна ОМБ) свідчить про виснаження резервно-адаптаційних можливостей організму протистояти оксидативному стресу. Оскільки синтез білків відбувається в печінці, виснаження антиоксидантних резервів, про що свідчить зростання індукційної ОМБ побічно свідчить про ступінь дистрофічних змін в гепатоцитах. Дистрофія гепатоцитів є одним із тригерів фіброгенезу в печінці.

Суть способу здійснюється наступним чином: стан окисної модифікації білків визначали за методом Дубініної Є.Є. Принцип методу полягає в тому, що в результаті окислення білків утворюються альдегідні та кетонні групи амінокислотних залишків білків, які взаємодіють з 2,4 денітрофенілгідразоном (2,4-ДНФГ). Утворені похідні 2,4-ДНФГ реєстрували при довжині хвилі 530 нм на спектрофотометрі "Spekol-11". На довжині хвилі 530 нм реєструються кетонденітрофенілгідразони (2,4 КДНФГ). Було проведено дослідження спонтанної ОМБ (вихідний рівень 2,4 КДНФГ) та індукованої ОМБ (накопичення 2,4 КДНФГ після стимуляції ОМБ середовищем Фентона: FeSO_4 та H_2O_2). Вміст 2,4 КДНФГ в нмолях на 1 мг білка розраховували з використанням коефіцієнту молярної екстинкції ($21000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) для похідних 2,4 - ДНФГ. Показник РАМ організму протистояти окислювальному стресу було розраховано за формулою (2,4 КДНФГ спонтанні $\times 100/2,4$ КДНФГ індуковані). Показник резервно-адаптаційних можливостей (РАМ) було розраховано за формулою (ОМБ спонтанна $\times 100/\text{ОМБ}$ індукована).

Для визначення показника РАМ обстежено 94 дитини з хронічним гепатитом С (ХГС) та 20 дітей з цирозом печінки, який встановлено за даними УЗД та морфологічного дослідження біоптату печінки. Серед 94 дітей з ХГС у 61 за даними УЗД були відсутні будь-які ознаки фіброзу печінки (таблиця).

Таблиця

- Ультразвукові критерії фіброзу печінки у дітей з хронічними гепатитами

Фіброз F 2-3	Відсутній фіброз
<ul style="list-style-type: none"> - Незначне збільшення печінки; - Дрібновогнищева дифузна ехогенна неоднорідність паренхіми без порушення її структури; - Збільшення кута лівої частки $> 45^\circ$ - $\text{ХЧ/ПЧ} > 0,55$; - Ущільнення глісонової капсули; - Потовщення глісонової капсули; - Гіперехогенні переважно трикутні та тубулярні ехоструктури в паренхімі печінки $6,84 \pm 0,20/\text{cm}^2$ 	<ul style="list-style-type: none"> - Печінка не збільшена, паренхіма однорідна в усіх відділах, ізоехогенна; - Кут правої частки - 45°; - $\text{ХЧ/ПЧ} < 0,55$; - Глісонова капсула рівна, однакової товщини до 0,5 мм; - Поодинокі гіперехогенні тубулярні та трикутні ехопозитивні структури в кількості $2,12 \pm 0,16/\text{cm}^2$

Проведено співставлення показників РАМ у дітей з відсутніми УЗД ознаками фіброзу печінки, з наявними УЗД змінами, які характерні для фіброзу F 2-3, та з цирозом печінки. В групі дітей з ХГС, які не мали УЗД ознак фіброзу печінки, РАМ становив ($M 55,1 \pm 16,3$ (SD); $\min - 22,2$ %; $\max - 84,6$ %); у дітей з УЗД ознаками фіброзу F 2-3 середній показник РАМ становив $M 46,9 \pm 13,9$ (SD); $\min - 15,2$ %; $\max - 78,1$ %); у хворих на цироз печінки середній показник РАМ - ($M 31,9 \pm 11,0$ (SD); $\min - 8,8$ %; $\max - 48,4$ %) Враховуючи те, що у більшості хворих, які мали цироз печінки показник РАМ становив менше 45 % ми вибрали цей критерій в якості діагностичного для прогресуючого фіброзу печінки (специфічність - 76 %; чутливість - 80 %). Проведені дослідження показали відсутність взаємозв'язку між активністю захворювання та показником РАМ.

Як альтернатива відомим способам оцінки виразності фібротичних змін в печінці, в заявленому способі запропонований біохімічний критерій оцінки ризику прогресуючого перебігу

ХГС у дітей, в основі якого представлені результати дослідження ОМБ та визначення показника РАМ організму

протистояти оксидативному стресу в порівнянні з даними УЗД печінки у дітей з ХГС.

Суть заявленого способу пояснюється такими прикладами:

5 Приклад 1

Дитина К., 15 років. Клінічний діагноз: ХГС, ПЦР+, генотип 3а, мінімальна активність. Тривалість захворювання - 6 років.

10 При госпіталізації стан задовільний. Скарг немає. Активна, апетит збережений. За даними біохімічного дослідження: АЛТ - 55 МО/л; АСТ-52 МО/л; загальний білок - 64 г/л, альбуміни - 37 г/л; загальний білірубін - 14 мкмоль/л, прямий - 2,4 мкмоль/л; ПТІ - 78 %. За даними УЗД дослідження: печінка не збільшена, глісонова капсула не потовщена, рівна, паренхіма незначно підвищеної ехогенності, кровотік в печінкових венах 3-фазний, діаметр портальної вени - 8 мм. Селезінка не збільшена, звичайної структури.

15 За результатами дослідження ОМБ встановлено, що кількість 2,4 КДНФГ до ініціації становила 0,07 нмоль/мг, після ініціації - 0,3 нмоль/мг, РАМ - 23 %. Отримані результати свідчать про наявність у даного хворого високого ризику прогресування ХГС.

Приклад 2

Дитина Н., 8 років. Клінічний діагноз: ХГС, ПЦР +, генотип 1а, мінімальна активність. Тривалість захворювання - 5 років.

20 При госпіталізації стан задовільний. Скарг немає. Активна, апетит збережений. За даними біохімічного дослідження: АЛТ - 57 МО/л; АСТ-64 МО/л; загальний білок - 78 г/л, альбуміни - 39 г/л; загальний білірубін - 11 мкмоль/л, прямий - 1,6 мкмоль/л; ПТІ - 75 %. За даними УЗД дослідження: печінка не збільшена, глісонова капсула не потовщена, рівна, паренхіма незначно підвищеної ехогенності, кровотік в печінкових венах 3-фазний, діаметр портальної вени - 5 мм. Селезінка не збільшена, звичайної структури.

25 За результатами дослідження ОМБ встановлено, що кількість 2,4 КДНФГ до ініціації становила 0,15 нмоль/мг, після ініціації - 0,27 нмоль/мг, РАМ - 55,5 %. Отримані результати свідчать про відсутність у дитини виразних морфофункціональних змін в печінці та дозволяє очікувати низькі темпи фіброгенезу.

30 Перевагою запропонованого способу є те, що прогресуючий перебіг захворювання діагностується у дітей з відсутньою клінічною симптоматикою та відсутніми або мінімальними змінами при УЗД дослідженні.

35 Таким чином, при створенні винаходу вирішувалась задача розробки способу, який би дозволив лікарю діагностувати прогресуючий перебіг ХГС у дитини раніше, ніж з'являться ультразвукові ознаки просунутого фіброзу.

Перевагою запропонованого способу є: використання для діагностики сироватки крові; достатньо висока специфічність та чутливість способу можливість динамічного спостереження за показником РАМ.

40 Спосіб може бути застосований в стаціонарах дитячих медичних закладах III-IV рівня акредитації.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

45 Спосіб діагностики прогресуючого перебігу хронічного гепатиту С у дітей, згідно з яким досліджують кількість 2,4-кетондинітрофенілгідрозонів (2,4-КДНФГ) в сироватці крові до ініціації процесів окислення білків (спонтанну окисну модифікацію білків) та після ініціації процесів окислення білків (індуковану окисну модифікацію білків), після чого розраховують показник резервно-адаптаційних можливостей за формулою:

50 спонтанна окисна модифікація білків x 100/індукована окисна модифікація білків, причому при рівні показника резервно-адаптаційних можливостей нижче за 45 % діагностують наявність високого ризику прогресуючого перебігу хвороби у хворих на хронічний гепатит С.

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

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