



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **77726** (13) **U**  
(51) МПК  
**G01N 33/48** (2006.01)

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: <b>u 2012 09567</b>	(72) Винахідник(и): <b>Пархоменко Людмила Костянтинівна (UA), Страшок Лариса Анатоліївна (UA), Бузницька Олена Вікторівна (UA)</b>
(22) Дата подання заявки: <b>06.08.2012</b>	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>25.02.2013</b>	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>25.02.2013, Бюл.№ 4</b>	(73) Власник(и): <b>ХАРКІВСЬКА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ ПІСЛЯДИПЛОМНОЇ ОСВІТИ, вул. Корчагінців, 58, м. Харків, 61176 (UA)</b>

## (54) СПОСІБ НЕІНВАЗИВНОЇ ДІАГНОСТИКИ ФІБРОЗУ ПЕЧІНКИ У ДІТЕЙ ТА ПІДЛІТКІВ ХВОРИХ НА ОЖИРІННЯ

### (57) Реферат:

Спосіб неінвазивної діагностики фіброзу печінки у дітей та підлітків з ожирінням шляхом дослідження сироватки крові імуноферментним методом. Проводять кількісне визначення рівня фібрoneктину та колагену IV типу і, при значеннях понад максимально допустимий рівень у нормі, діагностують фіброз печінки.

UA 77726 U



Корисна модель належить до галузі медицини, а саме до педіатрії (гастроентерології), і може бути використана для неінвазивної діагностики початкових стадій фіброзу печінки у дітей та підлітків хворих на ожиріння та об'єктивізації підстав для відбору пацієнтів для пункційної біопсії печінки. Може мати застосування для швидкої скринінгової діагностики фіброзу печінки у дітей з ожирінням в клінічній практиці.

На сучасному етапі неалкогольна жирова хвороба печінки (НАЖХП) асоціюється з ожирінням, інсулінорезистентністю, артеріальною гіпертензією та дисліпідемією і розглядається як печінкова маніфестація метаболічного синдрому (Успенский Ю.П. Метаболический синдром и неалкогольный стеатогепатит: причинно-следственный континуум / Ю.П. Успенский, Е.В. Балуква // Гастроэнтер. Приложение к журналу Consilium medicum. - 2009. - № 1. - С. 41-46.; Lewis J.R. Non-alcoholic Fatty Liver Disease: A Review and Update / J.R. Lewis, S.R. Mohanty // Digestive Diseases and Sciences. - 2010. - Vol. 55. - P. 560-578). Основним шляхом прогресування захворювання є процес фіброгенезу, який супроводжується відкладанням компонентів екстрацелюлярного матриксу (колаген I, II, IV типів, ламінін, фібронектин тощо) у просторах Дісе, що відображає послідовні етапи формування НАЖХП: стеатоз, стеатогепатит, стеатофіброз і стеатоцироз (Shimada M. Nonalcoholic steatohepatitis: risk factor for liver fibrosis / M. Shimada, E. Hashimoto, S. Noguchi, N. Hayashi // Hepat. Res. - 2002. - Vol. 24, № 4. - С. 429-438).

Тривалий час вважалося, що НАЖХП перебігає доброякісно, однак в останній час доведено, що у чверті (27 %) пацієнтів протягом 9 років розвивається фіброз, а у кожного п'ятого (19 %) - цироз будь-якого ступеня розповсюженості (Reynaert H. The treatment of non-alcoholic steatohepatitis with thiazolidinediones / H. Reynaert, A. Geerts, J. Henrion // Aliment. Pharmacol. Ther. - 2005. - Vol. 22. № 10. - P. 897-905]. При більш довгостроковому спостереженні прогресування фіброзу виявляється у 50 % хворих НАЖХП [Bacon B.R. Clinical course and prognosis of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) / B.R. Bacon // Falk Symposium Steatohepatitis. - Den Haag. - 2000. - P. 17), причому цей процес перебігає без клінічної маніфестації. Популяційні дослідження свідчать про те, що 80 % криптогенних цирозів печінки є результатом НАЖХП (Федоров И.Г. Неалкогольный стеатогепатит: клиника, патогенез, диагностика, лечение / И.Г. Федоров, И.Г. Никитин, Г.И. Сторожаков // Consilium medicum. - 2004. - Т. 6, № 6. - С. 401-405.; Хазанов А.И. Возможности прогрессирования алкогольного и неалкогольного стеатогепатита в цирроз печени / А.И. Хазанов // Рос. Журн. Гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. - 2005. - Т. 15, № 2. - С. 26-32).

Сьогодні відомо, що стеатоз (жировий гепатоз) - етап розвитку НАЖХП, який у популяції найбільш розповсюджений, - досить часто починає свій розвиток у підлітковому і навіть дитячому віці. Зв'язок між стеатозом, стеатогепатитом і розвитком фіброзу досі не вивчений. Морфологічні та біохімічні маркери інтенсивності фіброзоутворення при НАЖХП вказують на його наявність вже на етапі стеатозу (Хухлина О.С. Особенности патоморфологических и метаболических параметров фиброза печени у больных с алкогольной и неалкогольной жировой болезнью печени / О.С. Хухлина // Сучасна гастроентерологія. - 2005. - № 5 (25). - С. 34-40), хоча накопичення жирових включень гепатоцитами може тривало продовжуватися як фоновий стан. Саме тому, суттєве значення має своєчасна діагностика цієї патології, яка вважається зворотною на початкових стадіях (Григорьев П.Я. Жировой гепатоз (жировая инфильтрация печени): диагностика, лечение и профилактика / П.Я. Григорьев // Русский медицинский журнал. - 2002. - Т. 4, № 1. - С. 30-31).

"Золотим стандартом" діагностики фіброзу є прижиттєва біопсія печінки з гістологічною оцінкою біоптатів та визначенням стадій фіброзу печінки. Відомий спосіб діагностики та оцінки прогресування фіброзу печінки при НАЖХП. (Хухлина О.С. Особенности патоморфологических и метаболических параметров фиброза печени у больных с алкогольной и неалкогольной жировой болезнью печени / О.С. Хухлина // Сучасна гастроентерологія. - 2005. - № 5 (25). - С. 34-40; Подымовой С.Д. Жировой гепатоз. Неалкогольный стеатогепатит (эволюция представлений о клинко-морфологических особенностях, прогнозе, лечении) / С.Д. Подымова // Тер. Арх. - 2006. - Т. 78, № 4. - С. 32-38. Цей спосіб діагностики є інвазивним, достатньо травматичним, має ряд обмежень, в тому числі вікових, обумовлених можливими ускладненнями, значною варіабельністю отриманих зразків. Слід враховувати, що в педіатричній практиці біопсія проводиться, як правило, одноразово з метою первинної діагностики захворювання, а оцінка фіброзування в динаміці викликає складнощі. Крім цього, проведення цього дослідження не завжди є доступним у клінічній практиці.

Найбільш близьким за технічною суттю та результатом, що досягається, є спосіб діагностики фібротичних змін печінки у хворих на НАЖХП (Patent No.: US 7,670,764B2 Esther H.

Oh, Catherine M. Smith. Methods of diagnosing tissue fibrosis (US) Mar. 2, 2010), обраний за прототип.

Спосіб полягає у визначенні показників  $\alpha$ -2-макроглобуліну, гіалуронової кислоти, тканинного інгібітора металопротеїнази-1 сироватки крові методом імуноферментного аналізу. Для діагностики фіброзу при НАЖХП дослідниками було запропоновано використання індексу фіброзу за формулою, яка складається з показників вищеперерахованих серологічних маркерів. Результат 0,475 та вище свідчив про наявність фіброзу печінки при НАЖХП. На підставі досліджень у пацієнтів з НАЖХП та гістологічно підтвердженим фіброзом печінки встановлено перевищення результатів індексу біохімічних маркерів, що підтверджує його діагностичну цінність.

Спільними суттєвими ознаками прототипу і корисної моделі, що заявляється, є неінвазивність (проведення дослідження крові), інформативність, можливість застосування методів діагностики фіброзу печінки в динаміці для моніторингу патологічного стану та корекції терапії.

Недоліком прототипу є те, що за показником запропонованого індексу можна стверджувати про наявність фіброзу печінки, але стадія фіброзу не корелює з біохімічними показниками фіброгенезу печінки. Також параметри, які аналізуються ( $\alpha$ -2-макроглобулін, гіалуронова кислота, тканинний інгібітор металопротеїнази-1), не дають можливості встановити фіброз печінки на початкових етапах формування, що є принципово важливим для тактики лікування.

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалення способу діагностики фіброзу печінки у дітей та підлітків хворих на ожиріння, в якому за рахунок зміни досліджуваних показників, досягається визначення неінвазивних діагностичних критеріїв, які вірогідно підтверджують наявність фіброзу на ранніх стадіях розвитку, за рахунок чого можлива діагностика початкових етапів формування фіброзу печінки у дітей та підлітків з ожирінням, коли ще не має клінічних проявів НАЖХП.

Поставлена задача вирішується у способі неінвазивної діагностики фіброзу печінки у дітей та підлітків з ожирінням шляхом дослідження сироватки крові імуноферментним методом, згідно з корисною моделлю, проводять кількісне визначення рівня фібронектину та колагену IV типу і при значеннях понад максимально допустимий рівень у нормі діагностують фіброз печінки.

Ознаки, що відрізняють корисну модель від прототипу, мають суттєві переваги, а саме:

1. Як неінвазивні діагностичні критерії оцінюють прямі маркери фіброзу печінки (колаген IV типу -  $99 \pm 23$  мкг/л у нормі; фібронектин - 70-140 мкг/мл у нормі сироватки крові).

2. За рахунок наведених біохімічних показників можлива діагностика початкових етапів формування фіброзу печінки у дітей та підлітків з ожирінням, коли ще не має клінічних проявів НАЖХП.

3. Запропонований спосіб діагностики є швидким та високочутливим тестом як для скринінгової діагностики, так і для спостереження в динаміці за процесом фіброгенезу печінки.

4. З урахуванням вікових обмежень та інших протипоказань, заявлений спосіб діагностики може використовуватись як альтернатива біопсії печінки.

Спосіб, що заявляється, був проведений у відділенні ендокринології ДУ "Інститут охорони здоров'я дітей та підлітків НАМНУ", де було обстежено 226 хворих на ожиріння віком 8-18 років: 129 юнаків ( $57,08 \pm 3,29$  %), 97 дівчат ( $42,92 \pm 3,29$  %). Математичну обробку даних здійснено на персональному комп'ютері з використанням статистичної програми "Statistica". Вірогідність відмінностей оцінювали за критерієм t-Ст'юдента. Взаємозв'язок між показниками встановлювали за коефіцієнтом кореляції Пірсона.

Спосіб неінвазивної діагностики фіброзу печінки у дітей та підлітків з ожирінням, що заявляють, здійснюють таким чином: у хворого натщесерце беруть 6 мл венозної крові (по 3 мл на кожен маркер), для фібронектину попередньо у пробірку додають антикоагулянт (3,2 % цитратний буфер) у співвідношенні 10:1, після центрифугування крові для проведення дослідження відбирають сироватку та плазму. Методом імуноферментного аналізу в отриманих зразках крові хворих визначають фібронектин (Fibronectin ELISA Kit, ЗАТ "Биохиммак", Москва), колаген IV типу (Serum collagen IV EIA, Argutus Medical, Japan). Наявність зазначених маркерів у сироватці та плазмі крові обстежених осіб вище максимально допустимого рівня (для колагену IV типу -  $99 \pm 23$  мкг/л; для фібронектину - 70-140 мкг/мл) засвідчує наявність фіброзу печінки.

Приклад. Хворий А., 16 років, історія хвороби № 1345, 2012 р., був госпіталізований до відділення ендокринології ДУ "Інститут охорони здоров'я дітей та підлітків НАМНУ", зі скаргами на надлишкову масу тіла, періодичне відчуття дискомфорту у правому підребер'ї, слабкість. Із анамнезу: надмірною вагою страждає з дитинства, спадковість обтяжена на ожиріння. Об'єктивно: загальний стан відносно задовільний. Індекс маси тіла складає 34 (вище 97 перцентилля), обсяг талії (ОТ) - 109 см., обсяг стегон (ОС) - 117 см., ОТ/ОС=0,93 (андроїдний тип

ожиріння). Шкіряні покрови звичайного кольору, стрії в ділянках животу, стегон, плечей. Над легеньми - везикулярне дихання. Серцева діяльність ритмічна, тони приглушені. ЧСС=пульс=76 уд. за хв. При фізикальному обстеженні під час пальпації: живіт збільшений у розмірах за рахунок підшкірно-жирового шару, м'який, помірно болісний у правому підребер'ї. Печінка збільшена в розмірах (+ 2-3 см), еластичної консистенції. Порушень пігментного, білкового обмінів встановлено не було. Показники ліпідного спектра свідчили про атерогенний характер дисліпідемії: загальний холестерин - 4,5 ммоль/л, тригліцериди - 1,42 ммоль/л, ліпопротеїди високої щільності - 0,78 ммоль/л, ліпопротеїди низької щільності - 4,35 ммоль/л, ліпопротеїди дуже низької щільності - 0,64 ммоль/л, індекс атерогенності - 4,8. Рівні ферментів АЛТ, АСТ, ЩФ, ГГТП були в межах норми. Рівень глюкози крові натще складав 4,9 ммоль/л, імунореактивного інсуліну сироватки крові - 32 мкОД/мл, індекс НОМА - 7 у.о., тобто у підлітка мала місце інсулінорезистентність. При ультразвуковому дослідженні були визначені ознаки жирової дистрофії печінки у вигляді помірної гепатомегалії, зниження ехогенності органа, ущільнення стінок судин у поєднанні з дискінезією жовчного міхура за гіпотонічно-гіпокінетичним типом. Для діагностики фіброзу печінки, згідно з корисною моделлю, методом імунферментного аналізу визначалися рівні біохімічних маркерів: колаген IV типу - 152,3 мкг/л, фібронектин - 168,02 мкг/мл. На цій підставі підтверджують наявність фіброзу печінки, що вимагає подальшого спостереження за пацієнтом, з контролем біохімічних показників фіброзу печінки в динаміці та розробки стратегії антифібротичної терапії.

Використання запропонованого неінвазивного способу діагностики фіброзу печінки у дітей та підлітків з ожирінням у клінічній практиці, у порівнянні з прототипом, дозволяє вірогідно підтверджувати наявність фіброзу печінки на початкових стадіях патологічного процесу вже за результатами біохімічних досліджень та об'єктивно відбирати хворих, які потребують проведення біопсії печінки для визначення ступеня фіброзу та розробки стратегії антифібротичної терапії.

Розроблений неінвазивний спосіб діагностики є інформативним, зручним при використанні у клінічній практиці, дозволяє моніторувати в динаміці процес фіброгенезу печінки та мінімізувати ризик виникнення важких ускладнень шляхом проведення адекватної терапії.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб неінвазивної діагностики фіброзу печінки у дітей та підлітків з ожирінням шляхом дослідження сироватки крові імунферментним методом, який **відрізняється** тим, що проводять кількісне визначення рівня фібронектину та колагену IV типу і, при значеннях понад максимально допустимий рівень у нормі, діагностують фіброз печінки.