



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **78365** (13) **U**
(51) МПК (2013.01)
A61B 10/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2012 12455	(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	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 11.03.2013	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 11.03.2013, Бюл.№ 5	(73) Власник(и): ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ПЕДІАТРІЇ, АКУШЕРСТВА І ГІНЕКОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ", вул. П. Майбороди, 8, м. Київ, 04050 (UA)

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ ПРОГРЕСУВАННЯ ХРОНІЧНОГО ВІРУСНОГО ГЕПАТИТУ С У ДІТЕЙ

(57) Реферат:

Спосіб діагностики прогресування перебігу хронічного гепатиту С у дітей шляхом визначення білковозв'язаної фракції гідроксипроліну в сироватці крові. Досліджується кількість 2,4 кетондинітрофенілгідразонів в сироватці крові до ініціації та після ініціації з розрахунком показника резервно-адаптаційних можливостей, причому при рівні його нижче за 45 % діагностують наявність високого ризику прогресування перебігу хвороби у хворих на хронічний гепатит С.

UA 78365 U

Корисна модель належить до галузі медицини, а саме дитячої гастроентерології та гепатології і може бути використана 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., Ивашкин 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 повною мірою 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., В.К. Тищенко, Ю.В. Кудрей "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 корисної моделі поставлена задача 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 вирішується шляхом визначення кількості 2,4 кетонденітрофенілгідазонів 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 прогресування хронічного гепатиту С у дитини.

Суть способу здійснюється наступним чином: стан окисної модифікації білків визначали за методом Дубініної Є.Є. Принцип методу полягає в тому, що в результаті окиснення білків утворюються альдегідні та кетонні групи амінокислотних залишків білків, які взаємодіють з 2,4-динітрофенілгідразом (2,4-ДНФГ). Утворені похідні 2,4-ДНФГ реєстрували при довжині хвилі 530 нм на спектрофотометрі "Spekol-11". На довжині хвилі 530 нм реєструються кетондинітрофенілгідрозони (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 1).

Таблиця 1

Ультразвукові критерії фіброзу печінки у дітей з хронічними гепатитами

Фіброз F 2-3	Відсутній фіброз
Незначне збільшення печінки;	Печінка не збільшена, паренхіма однорідна в усіх відділах, ізоехогенна;
Дрібновогнищева дифузна ехогенна неоднорідність паренхіми без порушення її структури;	Кут правої частки - 45° ;
Збільшення кута лівої частки $> 45^\circ$ - $\text{ХЧ/ПЧ} > 0,55$;	$\text{ХЧ/ПЧ} < 0,55$;
Ущільнення глісонової капсули;	Глісонова капсула рівна, однакової товщини до 0,5 мм;
Потовщення глісонової капсули;	Поодинокі гіперехогенні тубулярні та трикутні ехопозитивні структури в кількості $2,12 \pm 0,16/\text{cm}^2$
Гіперехогенні переважно трикутні та тубулярні ехоструктури в паренхімі печінки $6,84 \pm 0,20/\text{cm}^2$	

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); $\text{min}-22,2 \%$; $\text{max}-84,6 \%$); у дітей з УЗД ознаками фіброзу F 2-3 середній показник РАМ становив $M 46,9 \pm 13,9$ (SD); $\text{min}-15,2 \%$; $\text{max}-78,1 \%$); у хворих на цироз печінки середній показник РАМ - ($M 31,9 \pm 11,0$ (SD); $\text{min}-8,8 \%$; $\text{max}-48,4 \%$) Враховуючи те, що у більшості хворих, які мали цироз печінки, показник РАМ становив менше 45 % ми вибрали цей критерій як діагностичний для прогресування 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 прогресування перебігу ХГС у дітей, в основі якого представлені результати дослідження ОМБ та визначення показника РАМ організму протистояти окислативному стресу в порівнянні з даними УЗД печінки у дітей з ХГС.

Суть заявленого способу пояснюється такими прикладами:

Приклад 1. Дитина К., 15 років. Клінічний діагноз: ХГС, ПЦР+, генотип 3а, мінімальна активність. Тривалість захворювання - 6 років

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 - 37г/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.

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 1a, мінімальна активність. Тривалість захворювання - 5 років.

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.

За результатами дослідження ОМБ встановлено, що кількість 2,4-КДНФГ до ініціації становила 0,15 нмоль/мг, після ініціації - 0,27 нмоль/мг, РАМ - 53,5 %. Отримані результати свідчать про відсутність у дитини виразних морфофункціональних змін в печінці та дозволяє очікувати низькі темпи фіброгенезу.

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

Таким чином, при створенні корисної моделі вирішувалось завдання розробки способу, який би дозволив лікарю діагностувати прогресуючий перебіг ХГС у дитини раніше, ніж з'являться ультразвукові ознаки просунутого фіброзу. Перевагами запропонованого способу є використання для діагностики сироватки крові; достатньо висока специфічність та чутливість способу, можливість динамічного спостереження за показником РАМ.

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

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб діагностики прогресування перебігу хронічного гепатиту С у дітей шляхом визначення білковозв'язаної фракції гідроксипроліну в сироватці крові, який **відрізняється** тим, що досліджується кількість 2,4 кетондинітрофенілгідразонів в сироватці крові до ініціації та після ініціації з розрахунком показника резервно-адаптаційних можливостей, причому при рівні його нижче за 45 % діагностують наявність високого ризику прогресування перебігу хвороби у хворих на хронічний гепатит С.

Комп'ютерна верстка С. Чулій

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