



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **111451** (13) **C2**
(51) МПК
G01N 33/48 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2015 05164**
(22) Дата подання заявки: **26.05.2015**
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **25.04.2016**
(41) Публікація відомостей про заяву: **10.12.2015, Бюл.№ 23**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **25.04.2016, Бюл.№ 8**

(72) Винахідник(и):
**Шеховцова Юлія Олександрівна (UA),
Журавльова Лариса Володимирівна (UA)**

(73) Власник(и):
**ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ,
пр. Леніна, 4, м. Харків, 61022 (UA)**

(74) Представник:
Євтушенко Тамара Григорівна

(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
Уніфікований клінічний протокол первинної, вторинної (спеціалізованої) медичної допомоги та медичної реабілітації "Хронічний панкреатит". - Наказ Міністерства охорони здоров'я від 10.09.2014 року № 638.-34 с.
A novel subtype of type 1 diabetes mellitus characterized by a rapid onset and an absence of diabetes-related antibodies/A. Imagawa, T. Hanafusa, J. Miyagawa et al.// N Engl J Med. – 2000.- V.342.- N.5.- P.301-307.
Low plasma apelin levels in newly diagnosed type 2 diabetes mellitus/ G. Erdem, T. Dogru, I. Tasci I. et al.// Exp Clin Endocrinol Diabetes. – 2008.- V.116.- N.5.- P.289-292.
Circulating apelin is increased in patients with type 1 or type 2 diabetes and is associated with better glycaemic control/ M. Habchi, L. Duvillard, V. Cottet V et al. // Clin Endocrinol (Oxf).- 2014.- V. 81.- N.5.- P.696-701.
Годлевський А. І. Особливості лікувальної тактики при гострому панкреатиті біліарної етіології у хворих із цукровим діабетом / А. І. Годлевський, С. І. Саволук, Я. В. Томашевський // Харківська хірургічна школа. - 2014. - № 2. - С. 21-24.
Журавльова Л.В. Діагностичні маркери та спосіб прогнозування розвитку хронічного панкреатиту при цукровому діабеті 2-го типу/ Л.В.Журавльова, Ю.О.Шеховцова //Международный эндокринологический журнал.- 2015.- Т. 67.- № 3.- С. 24-29.

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПАНКРЕАТИТУ ПРИ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТІ 2 ТИПУ

(57) Реферат:

UA 111451 C2

Винахід належить до способу діагностики розвитку хронічного панкреатиту при цукровому діабеті 2 типу, який включає дослідження сироватки крові та калу, причому розвиток хронічного панкреатиту діагностують за рівнями еластази-1, С-реактивного протеїну (СРП), апеліну, α -амілази та глікозильованого гемоглобіну (HbA1c), і при зниженні у хворих на цукровий діабет 2 типу значення рівня еластази-1 та зростанні значень рівнів СРП, апеліну, α -амілази та HbA1c у порівнянні із значеннями рівнів відповідних показників хворих на цукровий діабет без хронічного панкреатиту діагностують розвиток хронічного панкреатиту.

Винахід належить до медицини, а саме до внутрішніх хвороб, і може бути використаним для діагностики розвитку хронічного панкреатиту при цукровому діабеті 2 типу.

За даними епідеміологічних досліджень у 28-36 % хворих на *werhjd bq lsf, tn 2 nbge* (ЦД2) виявляється хронічний панкреатит (ХП) [Vujasinovic M. Low prevalence of exocrine pancreatic insufficiency in patients with diabetes mellitus / M. Vujasinovic, J. Zaletel, B. Tepes, B. Popic, J. Makuc, M. Epsek Lenart, M. Predikaka, S. Rudolf// *Pancreatology*.-2013.- Vol. 13(4).- P. 343-346]. Основні ланки патогенезу ЦД2 мають дуже тісні зв'язки із функціональним станом підшлункової залози (ПЗ). До них належать: оксидативний стрес, ендотеліальна дисфункція, зміни ліпідного та цитокінового спектра крові, дисбаланс між ендотеліальним фактором релаксації окису азоту та вазоконстрикторними факторами, коагуляцією та фібринолізмом [Ивашкин В.Т. Хронический панкреатит и стеатоз поджелудочной железы / В.Т. Ивашкин, О.С. Шифрин, И.А. Соколова. - М.: Литтерра, 2012.-200 с.].

Для діагностики загострень хронічного панкреатиту, в тому числі і можливих ускладнень цього захворювання, зазвичай рекомендується використовувати такі методи:

з метою оцінки активності запального процесу в підшлунковій залозі - визначення рівнів амілази, ліпази, різних так званих "запальних" цитокінів (інтерлейкіни I, II, VI і VIII, фактор некрозу пухлини (TNF- α), фактор активації тромбоцитів (PAF) та ін.); проведення еластазного тесту (імуноферментний метод);

з метою визначення стану зовнішньосекреторної недостатності підшлункової залози - а) аналіз клінічних даних за оцінкою кількості (обсягу) виділеного хворими калу, визначення наявності/відсутності стеатореї і креатореї; б) оцінка показників лабораторних методів дослідження - секретин-панкреозіміновий тест (церулеїновий), бентираміновий тест (ПАБК-тест), копрологічний тест (визначення еластази-1) з використанням моноклональних антитіл, Лунд-тест;

з метою виявлення органічних уражень підшлункової залози і прилеглих органів - інструментальні методи дослідження: оглядова рентгенографія, ультразвукове дослідження (УЗД), комп'ютерна томографія, езофагогастродуоденоскопія з ендоскопічною панкреатохолангіографією, радіонуклідна холецистографія і/або внутрішньовенна холангіографія;

додатково з метою виявлення пухлин підшлункової залози - дослідження маркерів пухлини (CA 19-9, ЕЕА), прицільна лапароскопічна або операційна (відкрита) так звана "тонкогolkова" біопсія.

Таким чином, активність запального процесу в підшлунковій залозі діагностують шляхом визначення рівнів амілази, ліпази, різних так званих "запальних" цитокінів (інтерлейкіни I, II, VI і VIII, фактор некрозу пухлини (TNF- α), фактор активації тромбоцитів (PAF) та ін.); проведення еластазного тесту (імуноферментний метод) [Уніфікований клінічний протокол первинної, вторинної (спеціалізованої) медичної допомоги та медичної реабілітації "Хронічний панкреатит". - Наказ Міністерства охорони здоров'я від 10.09.2014 року № 638.-34 с.].

Даний спосіб діагностики розвитку хронічного панкреатиту є найбільш близьким до того, що заявляється, за технічною суттю і результатом, який може бути досягнутим, тому його вибрано за прототип.

В основу винаходу поставлено задачу розробити спосіб діагностики розвитку хронічного панкреатиту при цукровому діабеті 2 типу шляхом визначення специфічних діагностичних маркерів для цього контингенту хворих.

Задачу, яку поставлено в основу винаходу, вирішують тим, що у відомому способі діагностики розвитку хронічного панкреатиту, який включає дослідження сироватки крові та калу, згідно з винаходом, при цукровому діабеті 2 типу розвиток хронічного панкреатиту діагностують за рівнями еластази-1, С-реактивного протеїну (СРП), апеліну, α -амілази та глікозильованого гемоглобіну (HbA1c), при цьому розвиток хронічного панкреатиту у хворих на цукровий діабет 2 типу діагностують при зниженні значення рівня еластази-1 та зростанні значень рівнів СРП, апеліну, α -амілази та HbA1c у порівнянні із значеннями рівнів відповідних показників хворих на цукровий діабет без хронічного панкреатиту.

Технічний ефект винаходу, а саме розробка способу діагностики розвитку хронічного панкреатиту при цукровому діабеті 2 типу шляхом визначення специфічних діагностичних маркерів для цього контингенту хворих, обумовлений синергізмом заходів, які заявляються.

Спосіб виконують наступним чином: При цукровому діабеті 2 типу розвиток хронічного панкреатиту діагностують за рівнями еластази-1, СРП, апеліну, α -амілази та HbA1c, при цьому розвиток хронічного панкреатиту у хворих на ЦД 2 типу діагностують при зниженні значення еластази-1 та зростанні значень СРП, апеліну, α -амілази та HbA1c у порівнянні із значеннями рівнів відповідних показників хворих на ЦД без ХП.

Ефективність способу доказана клінічними дослідженнями.

В дослідження були включені 94 (33 чоловіки та 61 жінка) хворих на ЦД2 середнім віком $58,94 \pm 1,02$ років, з них 32 пацієнти з ізольованим ЦД2 (44 %) склали 1 групу, а 62 пацієнти, яким був встановлений діагноз ХП (66 %), склали 2 групу. Верифікація діагнозу ХП проводилась на підставі стандартів обстеження хворих на ХП згідно з наказом МОЗ України № 638 від 10.09.2014 р. [Уніфікований клінічний протокол первинної, вторинної (спеціалізованої) медичної допомоги та медичної реабілітації "Хронічний панкреатит".- Наказ Міністерства охорони здоров'я від 10.09.2014 року № 638.-34 с.]. Діагноз ЦД2 встановлювався згідно наказу МОЗ України №1118 від 21.12.2012 р. [Уніфікований клінічний протокол первинної та вторинної (спеціалізованої) медичної допомоги "Цукровий діабет 2 типу".- Наказ Міністерства охорони здоров'я від 21.12.2012 №1118.-56 с.].

Всім пацієнтам було проведено вимірювання маси тіла, росту. Оцінку трофологічного статусу проводили за рекомендаціями ВООЗ (1997) за індексом маси тіла (ІМТ). ІМТ визначався за формулою: $ІМТ = \text{вага (кг)} / \text{ріст (м)}^2$ та вимірювався в кг/м^2 . Антропометричні виміри також містили вимірювання обхвату талії (ОТ) та стегон (ОС), визначено їх співвідношення - $ОТ (\text{см}) / ОС (\text{см})$. Значення показника $ОТ / ОС$ у жінок більше 0,85 та у чоловіків більше 0,90 свідчить про абдомінально-вісцеральне ожиріння.

Для верифікації діагнозу ХП та оцінки функціонального стану ПЗ використовували біохімічні та інструментальні методи дослідження. Функціональний стан ПЗ оцінювали за біохімічними показниками: вміст а-амілази (за біохімічним методом), вміст фекальної панкреатичної еластази-1 (за імуноферментним методом). Для оцінки наявності та активності запального процесу в ПЗ визначали рівень С-реактивного протеїну (СРП) в сироватці крові за латексним методом. Концентрацію глюкози в сироватці крові натще (ГКН) визначали глюкозооксидантним методом, також визначали толерантність до глюкози. Показники ліпідного спектра сироватки крові (рівень загального холестерину (ЗХС) та тригліцеридів (ТГ)) визначали ензиматичним колориметричним методом. Вміст холестерину ліпопротеїдів низької щільності (ХС ЛПНЩ) розраховували за формулою W.T. Friedewald. Оцінка рівня інсулінорезистентності (ІР) проводилась за допомогою HOMA (homeostasis model assessment) - моделі оцінки гомеостазу з розрахунком індексу ІР (HOMA-IR). При значенні HOMA-IR більше 2,77 діагностували наявність ІР.

Вміст в сироватці крові апеліну (С-термінального пептиду) та ФНО- α визначали імуноферментним методом ("Raybiotech" (USA) та "Вектор-бест" (Росія), відповідно).

Дослідження ПЗ виконано за стандартною методикою за допомогою ультразвукової діагностичної системи "Sonoline G-50". Достовірними критеріями ХП при УЗ-дослідженні були зміни розмірів ПЗ, нерівний контур, неоднорідна ехоструктура, гетерогенне посилення ехогенності, розширення головного панкреатичного протоку (ГГШ), кальцифікація та болючість при натисканні датчиком УЗД у зоні проекції ПЗ [Митьков В.В. Клиническое руководство по ультразвуковой диагностике в 5 томах / В.В. Митьков // М.: Видар.-2007.-Т. 5. - 360 с.].

Статистичну обробку результатів дослідження здійснювали з використанням пакетів програм Statistica 6.0. Для порівняння середніх у групах використовувався критерій Манна-Уїтні, який не передбачає нормальності розподілу вибірок в кожній групі порівняння. Кореляційні зв'язки визначалися за допомогою непараметричного коефіцієнта Спірмена.

Задача прогнозування ХП при ЦД2 вирішувалась за допомогою дискримінантного аналізу. Дискримінантний аналіз передбачає визначення дискримінантних функцій, змінних, найбільш інформативних для класифікації об'єктів та побудови класифікаційних функцій для вирішення задачі класифікації.

Вибір дискримінантних змінних з 26 вхідних інтервальних предикторів (показників клінічних та лабораторних досліджень) здійснювався покроковим методом шляхом виключення (включення) вхідних змінних (предикторів) відповідно до їх рівня толерантності (міра надлишковості предиктора для класифікації). При цьому вхідні предиктори перевірялись на відсутність мультиколінеарності - сильної лінійної залежності між ними, що є обмеженням методу. В результаті були отримані класифікаційні функції $Y_{ЦД2}$ та $Y_{ЦД2+ХП}$, які містили по п'ять вхідних предикторів.

Прогнозування ХП у хворих на ЦД2 здійснювалось шляхом обчислень значень класифікаційних функцій $Y_{ЦД2}$ і $Y_{ЦД2+ХП}$ для кожного хворого. При цьому хворий відносився до тієї групи (ЦД2 або ЦД2+ХП), чия класифікаційна функція була вища. Класифікаційні функції обчислювались за формулами:

$$Y_{ЦД2} = -152,65 + 0,68 \text{«еластаза-1»} + 22,37 \text{«HbA1C»} + 0,09 \text{«альфа-амілаза»} - 0,54 \text{«СРП»} + 0,02 \text{«апелін»}$$

$$Y_{ЦД2+ХП} = -121,95 + 0,59 \text{«еластаза-1»} + 19,77 \text{«HbA1C»} + 0,17 \text{«альфа-амілаза»} -$$

0,38«СРП»+0,03«апелін».

При проведенні дискримінантного аналізу оцінювались значення стандартизованих коефіцієнтів канонічних коренів та матриці факторної структури, що дозволило судити про значимість дискримінантних змінних в класифікації. Це дозволило ранжувати вибрані предиктори за важливістю їх в класифікацію в такому порядку: еластаза-1, СРП, апелін, α -амілаза та HbA1c. Зокрема, можна говорити, що прогноз наявності ХП у хворих на ЦД2 значною мірою обумовлений зниженням значення еластази-1 та зростанням СРП, апеліну, α -амілаза та HbA1c.

Вивчена частота ХП в залежності від маси тіла у хворих на ЦД2. Встановлено, що ХП вірогідно частіше зустрічається у хворих з підвищеною масою тіла - у 68 % хворих, і тільки у 32 % пацієнтів з нормальною масою тіла ($P<0,05$).

При оцінці трофологічного статусу пацієнтів з поєднаним перебігом ХП та ЦД2 значення ІМТ склало в середньому $29,46\pm 0,83$ кг/м², при цьому надлишкова маса тіла була діагностована у 23 %, 1-ий ступінь ожиріння - 26 %, 2-ий ступінь - 15 % та 3-ій ступінь ожиріння - 5 % хворих. ІМТ у пацієнтів з поєднаним перебігом ХП та ЦД2 на 23 % перевищував аналогічний показник хворих з ХП ($p<0,05$) (табл. 1).

Аналіз співвідношення ОТ/ОС показав, що хворі обох досліджуваних груп мають абдомінальний тип відкладення жирової тканини ($0,87\pm 0,02$ та $0,87\pm 0,01$, відповідно).

При вивченні функціонального стану ПЗ (табл. 1) показники рівнів еластази-1 у пацієнтів 2-ї групи були достовірно нижчі у порівнянні з 1-ї групою ($p<0,05$), що свідчило про взаємообтяжуючий характер метаболічних порушень при поєднаному перебігу захворювань та високий рівень формування фібротичних змін у ПЗ. Рівень СРП в сироватці крові хворих 2-ї групи вірогідно перевищував значення у хворих 1-ї групи ($p<0,05$) та корелював з ІМТ ($r=0,41$; $p<0,05$), з індексом ОТ/ОС ($r=0,49$; $p<0,05$), з рівнем ГКН ($r=0,50$; $p<0,05$), з рівнем НОМА-ІР ($r=0,57$; $p<0,05$), з рівнем ТГ ($r=0,58$; $p<0,05$), що свідчить про наявність системного запалення.

Таблиця 1

Антропометричні та лабораторні показники досліджуваних хворих ($M\pm m$)

Показник, од. вимірювання	Група 1: хворі на ЦД (n=32)	Група 2: хворі на ХП+СД2 (n=62)
ІМТ, кг/м ²	$26,77\pm 0,7$	$29,46\pm 0,83^*$
ОТ/ОС	$0,87\pm 0,02$	$0,87\pm 0,01$
Еластаза-1, мкг/г	$194,9\pm 2,98$	$131,4\pm 5,4^*$
α -амілаза, Од/л	$23,56\pm 1,31$	$25,64\pm 1,45$
СРП, мг/л	$0,78\pm 0,2$	$7,90\pm 0,94^*$
ГКН, ммоль/л	$8,8\pm 0,3$	$9,62\pm 0,26$
HbA1c, %	$7,3\pm 0,14$	$7,73\pm 0,17$
НОМА-ІР	$4,6\pm 0,32$	$7,92\pm 0,64^*$
Інсулін, мкМО/мл	$11,4\pm 0,58$	$17,16\pm 0,92^*$
ТГ, ммоль/л	$1,99\pm 0,11$	$2,41\pm 1,11^*$
ЗХС, ммоль/л	$4,95\pm 0,14$	$6,10\pm 0,15^*$
ХСЛПНЩ, ммоль/л	$3,02\pm 0,09$	$3,79\pm 0,12^*$
ХСЛПВЩ, ммоль/л	$1,21\pm 0,06$	$1,14\pm 0,04$
ФНП- α , пкг/мл	$49,97\pm 3,37$	$75,6\pm 5,65^*$
Апелін, пг/мл	$280,8\pm 6,86$	$349,97\pm 12,77^*$

Примітка: - достовірність відмінностей ($p<0,05$) у порівнянні з 1 групою.

Зниження чутливості тканин до інсуліну за критерієм НОМА-ІР спостерігалось у 94 % хворих обох груп. Встановлено, що рівень ІР у хворих 2-ї групи корелював з еластазою-1 ($r=-0,56$; $p<0,05$), СРП ($r=0,57$; $p<0,05$). Кореляційний аналіз також виявив позитивні зв'язки між показниками НОМА-ІР та ІМТ ($r=0,52$; $p<0,05$), а також рівнем ТГ ($r=0,34$; $p<0,05$).

Порушення ліпідного обміну достовірно частіше зустрічались у хворих 2-ї групи, у порівнянні з пацієнтами 1-ї групи ($p<0,05$). При цьому у 79 % хворих 2-ї групи була виявлена гіперхолестеринемія, у 93,5 % - підвищення ХСЛПНЩ, а зниження рівня ХСЛПВЩ - 87 % пацієнтів ($p<0,05$). Рівень ЗХС у хворих 2-ї групи був достовірно вищий, ніж в 1-й групі ($p<0,05$). Рівень ТГ в сироватці крові у пацієнтів 2-ї групи в 1,2 рази перевищував показники пацієнтів 1-ї групи ($p<0,05$), що пов'язано з посиленням синтезом ТГ та ХСЛПДНЩ у печінці, внаслідок чого

синтезуються і ХСЛПНЩ, які відкладаються у тканині ПЗ в тому числі. Підвищення концентрації ЗХС та ТГ в 2-й групі пацієнтів прямо залежало від ІМТ ($r=0,79$, $p<0,05$; $r=0,46$, $p<0,05$, відповідно).

При аналізі показників адипоцитокінів в 2-й групі хворих спостерігалось вірогідне підвищення рівнів апеліну та ФНП- α в сироватці крові у порівнянні з 1-ю групою ($p<0,05$). В 2-й групі встановлені кореляційні взаємозв'язки між показниками ФНП- α та еластазою-1 ($r=-0,66$; $p<0,05$), а також СРП ($r=0,48$; $p<0,05$). Також в 2-й групі виявлені позитивні зв'язки між рівнями апеліну та ІМТ ($r=0,50$; $p<0,05$), співвідношенням ОТ/ОС ($r=0,55$; $p<0,05$), ЗХС ($r=0,38$; $p<0,05$), ХСЛПНЩ ($r=0,38$; $p<0,05$) та ТГ ($r=0,56$; $p<0,05$), ГКН ($r=0,59$; $p<0,05$), індексом НОМА-IR ($r=0,70$; $p<0,05$), а також негативний зв'язок з ХСЛПВЩ ($r=-0,41$; $p<0,05$).

За результатами прогнозування методом дискримінантного аналізу з урахуванням апостеріорної класифікації, тобто у випадку, коли наявність ХП у хворого на ЦД2 не відома, можна судити про точність прогнозування на основі отриманих класифікаційних функцій. Зроблений аналіз для всієї вибірки хворих на ЦД2 (94 пацієнти) показав високу точність прогнозу (процент правильно передбачених випадків) на рівні 90,4 % (85 з 94). Результати цього аналізу наведені у табл. 2.

Таблиця 2

Матриця класифікації хворих на ЦД2

Групи, які спостерігались	Групи за попередньої оцінки		
	Процент правильно передбачених випадків, %	ЦД2, випадків	ЦД2+ХП, випадків
ЦД2	84,37 %	27	5
ЦД2+ХП	93,55 %	4	58
Всього	90,45 %	31	63

Щодо прогностичної цінності запропонованого методу можна судити й за такими критеріями як: чутливість (процент правильно передбачених випадків ХП) - 93,55 % (58 з 62); специфічність (процент правильно передбачених випадків відсутності ХП) - 84,37 % (27 з 32).

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Спосіб діагностики розвитку хронічного панкреатиту, який включає дослідження сироватки крові та калу, який **відрізняється** тим, що при цукровому діабеті 2 типу розвиток хронічного панкреатиту діагностують за рівнями еластази-1, С-реактивного протеїну (СРП), апеліну, α -амілази та глікозильованого гемоглобіну (HbA1c), при цьому розвиток хронічного панкреатиту у хворих на цукровий діабет 2 типу діагностують при зниженні значення рівня еластази-1 та зростанні значень рівнів СРП, апеліну, α -амілази та HbA1c у порівнянні із значеннями рівнів відповідних показників хворих на цукровий діабет без хронічного панкреатиту.

Комп'ютерна верстка В. Мацело

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601