



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **77798** (13) **U**
(51) МПК
G01N 33/48 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2012 10338	(72) Винахідник(и): Пархоменко Людмила Костянтинівна (UA), Страшок Лариса Анатоліївна (UA), Бузницька Олена Вікторівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 31.08.2012	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.02.2013	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.02.2013, Бюл.№ 4	(73) Власник(и): ХАРКІВСЬКА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ ПІСЛЯДИПЛОМНОЇ ОСВІТИ, вул. Корчагінців, 58, м. Харків, 61176 (UA)

(54) СПОСІБ НЕІНВАЗИВНОЇ ДІАГНОСТИКИ ФІБРОЗУ ПЕЧІНКИ НА РАННІХ СТАДІЯХ ФОРМУВАННЯ У ДІТЕЙ ТА ПІДЛІТКІВ З ОЖИРІННЯМ

(57) Реферат:

Спосіб неінвазивної діагностики фіброзу печінки на початкових етапах формування у дітей та підлітків з ожирінням здійснюють шляхом імуноферментного аналізу сироватки крові. Проводять кількісне визначення рівня N-термінальних пропептидів колагену I типу та C-термінальних телопептидів колагену I типу. При значеннях N-термінальних пропептидів колагену I типу вище максимально допустимих рівнів поряд із нормальними або дещо зниженими показниками C-термінальних телопептидів колагену I типу діагностують переважання процесів фіброгенезу над процесами фібринолізу, що встановлює наявність фіброзу печінки.

UA 77798 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 і підлітків хворих на ожиріння та підтвердження доцільності проведення пункційної біопсії печінки. Може застосовуватись для скринінгової діагностики фіброзу печінки у дітей з ожирінням в клінічній практиці.

В теперішній час висувається гіпотеза, згідно з якою органи шлунково-кишкового тракту відіграють ключову роль у патогенезі метаболічних порушень, які призводять до розвитку інсулінорезистентності (ІР), ожиріння, дисліпідемії, при цьому вони самі стають органами-мішенями. Ця концепція у сучасній літературі розглядається з трьох принципових позицій: 1. поєднання компонентів метаболічного синдрому (МС) та захворювань органів травлення; 2. вплив метаболічних порушень на функціональний стан та морфологію органів шлунково-кишкового тракту; 3. роль патології органів травлення та її вплив на формування дисметаболічного статусу (Лазебник Л. Б. Метаболический синдром и органы пищеварения. / Л. Б. Лазебник, Л. А. Звенигородская. - М.: Анахарсис, 2009. - 184 с; Полунина Т. Е. Неалкогольный стеатоз печени в практике интерниста / Т. Е. Полунина, И. В. Маев // Эффективная фармакотерапия в гастроэнтерологии. - 2009. - № 1. - С. 14-19).

З'являється все більше доказів того, що головна роль у порушенні ліпідного та вуглеводного обмінів належить печінці. З однієї сторони, при МС мають місце зміни в печінці, з іншої - патологічні зміни печінки обумовлюють порушення ліпідного, вуглеводного та інших обмінів. Таким чином, жирова хвороба печінки - це один із ключових моментів патогенезу МС, а печінка та її змінені, у даному випадку, функції - орган, у якому замикається патологічне коло патогенезу цього синдрому.

Неалкогольна жирова хвороба печінки (НАЖХП) зустрічається у більшій частині людей з надмірною вагою тіла як дорослих, так і дітей. Точних статистичних даних про поширеність НАЖХП немає, однак, за думкою багатьох авторів, НАЖХП виявляється у різних країнах Європи у 10 - 40 % в загальній популяції населення і 57 - 74 % серед людей з ожирінням та надлишковою вагою, сягаючи 90 - 100 %, переважно за рахунок стеатозу. У підлітків НАЖХП більш поширена серед хлопчиків з ожирінням, ніж у дівчаток з ожирінням (44 % і 7 % відповідно). Є повідомлення про випадки НАЖХП, що виявляються у віці 10 - 20 років. Так, в країнах Євросоюзу дана патологія виявляється у 2,6 % дітей, тоді як у дітей з надмірною масою тіла - у 22,5 - 52,8 %. Доведено, що з підвищенням ступеня ожиріння, важкості ІР, підвищується ризик розвитку НАЖХП (Ткаченко Е. И. Неалкогольная жировая болезнь печени и метаболический синдром: единство патогенетических механизмов и подходов к лечению / Е. И. Ткаченко, Ю. П. Успенский, Л. Н. Белоусова, В. В. Петренко // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. - 2008. - № 2. - С. 92-96; Leuschner U. Steatohepatitis (NASH and ASH) / U. Leuschner, O.F.W James, H. Dancygier // Dr. Falk Pharma GmbH. - 2005. - P. 35-39).

У цілому морфо-клінічні характеристики НАЖХП при ожирінні поділяються на відомі послідовні етапи: I. стеатоз - переважання жирової дистрофії гепатоцитів над всіма іншими морфологічними змінами; II. стеатогепатит - наявність запальних інфільтратів як у стромі, так і в паренхімі, вогнищеві некрози; III. стеатофіброз - переважання фіброзу портальної стромы, але без порушення часточкової структури; IV. стеатоцироз - порушення часточкової структури печінки (Павлов Ч. С. Оценка эффективности лечения неалкогольного стеатогепатита с использованием методов неинвазивной диагностики / Ч. С. Павлов, Д. В. Глушков // Русский медицинский журнал. - 2009. - Т. 17. - № 5. - С. 322-327).

Відомим є те, що фіброз печінки є прогресуючим патологічним процесом і загальним наслідком хронічного захворювання печінки будь-якої етіології, в тому числі НАЖХП (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). За даними провідних наукових досліджень встановлений той факт, що морфологічні та біохімічні маркери інтенсивності фіброзоутворення при НАЖХП підтверджують 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.), ступінь якого, зазвичай, відповідає вираженості фіброзу (Ильченко Л. Ю. Повреждение клеточных мембран при алкогольном и неалкогольном стеатогепатитах и их коррекция / Л. Ю. Ильченко, Е. В. Винницкая // Эксп. клин. гастроэнтерол. - 2002. - № 1. - С. 64-65.). Таким чином, питання своєчасної діагностики фіброзу печінки у дітей та підлітків хворих на ожиріння залишається актуальним і досі не вирішеним, що потребує подальшого вивчення для вдосконалення ранньої діагностики стеатофіброзу та лікувально-профілактичних заходів (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).

На сьогоднішній день прийнято вважати біопсію печінки «золотим стандартом» діагностики фіброзу та цирозу печінки. Однак, в педіатричній практиці через вікові протипоказання, інвазивність, а також небезпеку розвитку ускладнень, використання цього методу діагностики значно обмежено. Також висока мінливість вибірки пункційного матеріалу при біопсії не відображає реальну гістологічну картину печінки, яку можна одержати лише при дослідженні всього органу в цілому. Окрім того, потреба регулярного контролю ефективності проведеного лікування потребує розробки швидкого неінвазивного методу моніторингу за станом фібротичних змін у печінці, що також обмежує біопсійний метод діагностики через неможливість його частого застосування.

Відомий неінвазивний спосіб діагностики фібротичних змін печінки, як альтернатива біопсії - Фібро Тест [Poynard T. et al. Overview of diagnostic value of biochemical markers of liver fibrosis (FibroTest, HCVFibroSure) and necrosis (ActiTest) in patients with chronic hepatitis C. - Comparative Hepatology. - 2004. - Vol. 3. - P. 8], вибраний за прототип. Суть останнього полягає в тому, що в периферичній крові пацієнта визначають певні глікопротеїди, які приймають участь у формуванні фіброзу печінки, а саме, α -2-макроглобулін, гаптоглобін, аполіпопротеїн А-1. Спільними суттєвими ознаками прототипу і корисної моделі, що заявляється, є можливість одномоментного визначення наявності фіброзу печінки, неінвазивність (проведення дослідження крові), інформативність, можливість повторного застосування методів діагностики фіброзу печінки в динаміці для моніторингу патологічного стану та корекції терапії.

Проте й Фібро Тест має певні недоліки. За результатами даного методу діагностики можна стверджувати про наявність фіброзу печінки або його відсутність, але він не дає надійної інформації стосовно прогресування фіброзу. Також біохімічні показники, що аналізуються (α -2-макроглобулін, гаптоглобін, аполіпопротеїн А-1), не дають підстав для встановлення фіброзу печінки на самих ранніх стадіях формування. Даний метод був апробований переважно у хворих з хронічним вірусним гепатитом. Крім того, виконання даного дослідження відбувається в спеціалізованих діагностичних центрах, які є не у кожному місті, аналіз результатів проводиться в лабораторії у Франції, після чого електронною поштою передаються через декілька днів. Ці обставини суттєво обмежують його використання в більшості лікувальних закладів України.

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалення способу неінвазивної діагностики фіброзу печінки на ранніх стадіях формування у дітей та підлітків з ожирінням, в якому за рахунок зміни досліджуваних показників досягається отримання високочутливого та інформативного методу діагностики, який дозволить у хворих на НАЖХП, що розвинулась на тлі ожиріння, діагностувати фіброз печінки на початкових етапах формування.

Поставлена задача вирішується у спосіб неінвазивної діагностики фіброзу печінки на ранніх стадіях формування у дітей та підлітків з ожирінням шляхом імуноферментного аналізу сироватки крові, згідно з корисною моделлю, проводять кількісне визначення рівня N - термінальних пропептидів колагену I типу та C - термінальних телопептидів колагену I типу, при значеннях N-термінальних пропептидів колагену I типу вище максимально допустимих рівнів поряд із нормальними, або дещо зниженими показниками C-термінальних телопептидів колагену I типу діагностують переважання процесів фіброгенезу над процесами фібринолізу, що встановлює наявність фіброзу печінки.

Ознаки, що відрізняють корисну модель від прототипу, мають суттєві переваги, а саме: як діагностичні критерії фіброзу печінки неінвазивним шляхом визначають маркери двох фізіологічно протидіючих процесів - фіброгенезу (N-термінальних пропептидів колагену I типу) і фібринолізу (C-термінальних телопептидів колагену I типу) з наступною оцінкою переваги одного із них.

За рахунок дослідження на молекулярному рівні наведених біохімічних показників стає можливою діагностика початкових стадій фіброзу печінки у дітей та підлітків з ожирінням, задовго до клінічної маніфестації НАЖХП та морфологічного підтвердження шляхом пункційної біопсії печінки.

Заявлений спосіб діагностики є надійним і високочутливим тестом, який може використовуватися як для швидкої скринінгової діагностики, так і для динамічного спостереження за процесом фіброгенезу печінки на тлі терапії.

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

Спосіб неінвазивної діагностики фіброзу печінки у дітей та підлітків з ожирінням, що заявляють, здійснюють таким чином. У хворого натщесерце беруть 4 мл венозної крові (по 2 мл

на кожен маркер), після центрифугування крові для проведення дослідження відбирають сироватку. Методом твердофазного імуноферментного аналізу в отриманих зразках крові хворих проводять кількісне визначення рівня N-термінальних пропептидів колагену I типу у пмоль/л з використанням моноклональних антитіл різної епітопної специфічності за допомогою комерційного набору NT-proCNP, Biomedica (Austria). Концентрація N-термінальних пропептидів колагену I типу у крові коливається в залежності від віку і статі - препубертат: дівчата - $5,87 \pm 0,334$; юнаки - $4,52 \pm 0,324$; пубертат: дівчата - $4,98 \pm 0,268$; юнаки - $6,1 \pm 0,274$; постпубертат: дівчата - $3,75 \pm 0,147$; юнаки - $4,9 \pm 0,352$ пмоль/л.

Кількісне визначення рівня C-термінальних телопептидів колагену I типу у нг/мл в сироватці крові проводять методом твердофазного імуноферментного аналізу за участі моноклональних антитіл з використанням набору Serum CrossLaps Elisa, Immunodiagnostic Systems Ltd (UK) згідно з інструкцією до набору. Рівні C-термінальних телопептидів колагену I типу коливаються в залежності від віку і статі - препубертат: дівчата - $2,029 \pm 0,361$; юнаки - $1,883 \pm 0,374$; пубертат: дівчата - $2,266 \pm 0,368$; юнаки - $2,281 \pm 0,474$; постпубертат: дівчата - $0,821 \pm 0,447$; юнаки - $1,069 \pm 0,552$ нг/мл.

Наявність в сироватці крові N-термінальних пропептидів колагену I типу вище максимально допустимих рівнів поряд із нормальними або дещо зниженими показниками C-термінальних телопептидів колагену I типу свідчить про переважання процесів фіброгенезу над процесами фібринолізу та підтверджує наявність фіброзу печінки.

Дослідження запропонованим способом були проведені у відділенні ендокринології ДУ "Інститут охорони здоров'я дітей та підлітків НАМНУ", де під спостереженням знаходились 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.

Приклад: хворий С., 14 років, історія хвороби № 342, 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, підвищену втомлюваність. Із анамнезу: надмірною вагою страждає з 9 років, спадковість обтяжена на ожиріння за материнською лінією. Об'єктивно: загальний стан відносно задовільний. Індекс маси тіла складає 32 (вище 97 перцентилі), обсяг талії (ОТ) - 103 см, обсяг стегон (ОС) - 112 см, ОТ/ОС = 0,91 (андроїдний тип ожиріння). Шкіряні покрови звичайного кольору, білі стрії в ділянках животу, стегон, плечей. Над легеньми - везикулярне дихання. Серцева діяльність ритмічна, тони приглушені. ЧСС=пульс=80 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 (+ 1,5 - 2 см), еластичної консистенції. Порушень пігментного, білкового обмінів встановлено не було. Показники ліпідного спектру свідчили про атерогенний характер дисліпідемії: загальний холестерин - 4,3 ммоль/л, тригліцериди - 1,94 ммоль/л, ліпопротеїди високої щільності - 0,56 ммоль/л, ліпопротеїди низької щільності - 4,61 ммоль/л, ліпопротеїди дуже низької щільності - 0,88 ммоль/л, індекс атерогенності - 5,7 у.о. Рівні ферментів АЛТ, АСТ, ЩФ, ГГТП були в межах норми. Рівень глюкози крові натще складав 4,7 ммоль/л, імунореактивного інсуліну сироватки крові - 52,3 мкОД/мл, індекс НОМА - 11,5 у.о., тобто у підлітка була встановлена інсулінорезистентність. При ультразвуковому дослідженні були виявлені ознаки жирової дистрофії печінки у вигляді помірної гепатомегалії, зниження ехогенності органу, ущільнення стінок судин у поєднанні з дискінезією жовчного міхура за гіпотонічно-нормокінетичним типом. За даними реогепаатографії встановлено зниження кровонаповнення судин печінки, порушення венозного відтоку. Згідно з результатами статичної гепатосцинтиграфії у хворого мали місце помірні порушення рівномірності розподілу радіофармпрепарату без вогнищевих уражень, збільшення розмірів печінки, "блідість" лівої частки, а також нечіткість контурів зображення та зниження контрастування органу. Для діагностики фіброзу печінки, згідно з корисною моделлю, методом імуноферментного аналізу визначалися рівні біохімічних маркерів: N-термінальних пропептидів колагену I типу - $11,902$ пмоль/л; C-термінальних телопептидів колагену I типу - $2,191$ нг/мл.

Отримані результати свідчать про переважання процесів фіброгенезу над процесами фібринолізу та підтверджують наявність початкових стадій фіброзу печінки, що потребує подальшого спостереження за пацієнтом, з контролем біохімічних показників фіброзу печінки в динаміці та розробки стратегії антифібротичної терапії.

Застосування заявленого неінвазивного способу ранньої діагностики фіброзу печінки у дітей та підлітків з ожирінням, у порівнянні з прототипом, дає можливість своєчасно встановлювати

- наявність фіброзу печінки на початкових етапах формування або його відсутність шляхом визначення біохімічних маркерів сироватки крові та прийняти рішення про доцільність проведення біопсії печінки, розробки стратегії антифібротичної терапії. Запропонований неінвазивний спосіб діагностики засвідчив свою інформативність, надійність та зручність у використанні в клінічній практиці, що дозволяє проводити контроль у динаміці за процесом фіброгенезу печінки, поряд із лікувально-профілактичними заходами.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 10 Спосіб неінвазивної діагностики фіброзу печінки на початкових етапах формування у дітей та підлітків з ожирінням, який здійснюють шляхом імуноферментного аналізу сироватки крові, який **відрізняється** тим, що проводять кількісне визначення рівня N-термінальних пропептидів колагену I типу та C-термінальних телопептидів колагену I типу, при значеннях N-термінальних пропептидів колагену I типу вище максимально допустимих рівнів поряд із нормальними або
- 15 дещо зниженими показниками C-термінальних телопептидів колагену I типу діагностують переважання процесів фіброгенезу над процесами фібринолізу, що встановлює наявність фіброзу печінки.

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

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