



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **91240** (13) **U**
(51) МПК (2014.01)
A61B 5/00
G01N 33/49 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2014 00963	(72) Винахідник(и): Дорош Олена Григорівна (UA), Алексєєва Ірина Ігорівна (UA), Чернявська Ірина Вікторівна (UA), Черняєва Анна Олександрівна (UA), Кравчун Нона Олександрівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 03.02.2014	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.06.2014	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.06.2014, Бюл.№ 12	(73) Власник(и): ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ ЕНДОКРИННОЇ ПАТОЛОГІЇ ІМ. В.Я. ДАНИЛЕВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ", вул. Артема, 10, м. Харків, 61002 (UA)

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ НЕАЛКОГОЛЬНОЇ ЖИРОВОЇ ХВОРОБИ ПЕЧІНКИ У ХВОРИХ НА ЦУКРОВИЙ ДІАБЕТ 2 ТИПУ

(57) Реферат:

Спосіб діагностики неалкогольної жирової хвороби печінки у хворих на цукровий діабет 2 типу шляхом визначення функціональних біохімічних показників. Вимірюють вміст 8-ізопростагландину в сироватці крові і при його значенні понад 344,1 нг/мл діагностують неалкогольну жирову хворобу печінки.

U
UA 91240

Корисна модель належить до медицини, а саме ендокринології, і може бути використана при обстеженні хворих на цукровий діабет (ЦД) 2 типу з метою своєчасного виявлення неалкогольної жирової хвороби печінки (НАЖХП).

На даний час існує достатньо доказів щодо частого розвитку НАЖХП у хворих на ЦД 2 типу [1, 2]. Встановлено, що НАЖХП є одним із важливих факторів ризику розвитку серцево-судинних захворювань. НАЖХП і ЦД 2 типу тісно взаємопов'язані з такими складовими метаболічних порушень, як інсулінорезистентність (ІР), вісцеральне ожиріння, гіпертригліцеридемія, а також на додаток до цього провідна роль у формуванні неалкогольного стеатогепатиту (НАСГ) належить такому ключовому патогенетичному механізму, як оксидативний стрес (ОС). Індикатором активності ОС може служити збільшення продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) і ступінь втрати антиоксидантних ресурсів. Клітинні відповіді на окислювальний стрес різноманітні, найбільш вагомими з них: активація генів проліферації, генів апоптозу, експресія цитокінів, пошкодження ДНК, цитотоксичність.

Сучасні уявлення про патогенез НАЖХП включають два етапи її розвитку - теорія "двох ударів" - "two-hits model". ІР призводить до вивільнення і збільшення поглинання гепатоцитами вільних жирних кислот і блокування процесу β -окиснення. Компенсаторна гіперінсулінемія зменшує синтез аполіпопротеїну В-100, що і є "першим ударом". У відповідь на це збільшується чутливість печінки до стресових факторів "другого удару", формування якого належить активним формам кисню і прозапальним цитокінам, таким як фактор некрозу пухлини- α , інтерлейкін-6, інтерлейкін-8. Саме на даному етапі і відбувається трансформація стеатозу в стеатогепатит із подальшим розвитком сполучної тканини і фіброзу печінки [3, 4].

Основою діагностики НАЖХП є морфологічне дослідження печінки, але проведення біопсії є інвазивним методом, який може викликати додаткові ускладнення. Також для діагностики НАЖХП застосовуються ультразвукове дослідження, комп'ютерна та магнітно-резонансна томографія, але ці методи потребують спеціалізованого високовартісного обладнання.

Відомий спосіб діагностики НАЖХП у хворих на ЦД 2 типу, який полягає у визначенні показників функціонального стану жирової тканини, плазмової концентрації резистину та інсуліноподібного фактора росту [5]. Даний спосіб діагностики НАЖХП у хворих на ЦД 2 типу є найбільш близьким за технічною суттю і може бути вибраним як найближчий аналог (прототип).

Основним недоліком способу-прототипу є його недостатня специфічність, тому актуальним лишається розширення переліку маркерів НАЖХП у хворих на ЦД 2 типу.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити чутливий, неінвазивний спосіб діагностики НАЖХП у хворих на ЦД 2 типу.

Поставлена задача вирішується тим, що у хворих на ЦД 2 типу для діагностики НАЖХП вимірюють вміст 8-ізопростагландину в сироватці крові і при його значенні понад 344 пг/мл діагностують НАЖХП.

Технічний результат - розширення переліку біомаркерів НАЖХП у хворих на ЦД 2 типу, що дає змогу проводити більш точну діагностику захворювання.

Будучи продуктом метаболізму арахідонової кислоти, 8-ізопростагландин може служити надійним маркером рівня ОС в організмі при різній патології [6, 7]. У сучасній літературі представлені дані про підвищення рівня 8-ізопростагландину при нейродегенеративних захворюваннях, ішемічній хворобі серця, артеріальній гіпертензії [8, 9].

Згідно з рядом досліджень, поєднання ЦД і НАЖХП прискорює виникнення і прогресування серцево-судинної патології в основі якої лежить системна запальна відповідь. Тому визначення саме 8-ізопростагландину серед хворих із НАЖХП та ЦД 2 типу є патогенетично обґрунтованим.

Наші дослідження встановили взаємозв'язок вмісту 8-ізопростагландину в сироватці крові з показниками вуглеводного, ліпідного, білкового обмінів та функціонального стану печінки. Це дає підстави для розгляду 8-ізопростагландину як маркера НАЖХП.

Спосіб апробовано у клініці ДУ "Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського НАМН України" на 77 хворих з ЦД 2 типу, із них 23 особи з ЦД 2 типу в сполученні з НАЖХП (І група), середній вік - $(57,26 \pm 2,061)$ років; 30 осіб з ЦД 2 типу (ІІ група), середній вік - $(55,9 \pm 1,72)$ років; 24 особи з ЦД 2 типу в сполученні з НАЖХП в стадії стеатозу (ІІІ група), середній вік - $(61,4 \pm 6,96)$ років, а також 10 здорових осіб (ІV група), середній вік склав $(33,8 \pm 3,03)$ років.

Вміст 8-ізопростагландину в сироватці крові визначали імуноферментним методом за допомогою набору "8-iso-prostane ELISA" фірми "Enzo Life Sciences", США. Отримані дані виражалися в пг/мл. У обстежуваних були також визначені й інші показники ОС, розвиток якого є одним з проявів такої поєднаної патології, як ЦД 2 типу та НАЖХП. Показники ПОЛ визначали за вмістом дієнових (ДК), триєнових (ТК), оксидієнових (ОДК), тетраєнових (ТрК) кон'югатів і

малонового діальдегіду (МДА) спектрофотометричним методом з використанням коефіцієнта молярного поглинання продуктів. Отримані дані наведені в таблиці.

Таблиця

Рівень показників оксидативного стресу і вміст 8-ізопростагландину

Параметр	ЦД 2 типу + НАЖХП (I група)	ЦД 2 типу (II група)	ЦД 2 типу + НАЖХП на стадії стеатозу (III група)	Здорові особи (IV група)	P
ДК, нмоль/л	436,7±63,7	375,4±36,6	345,7±32,7	57,6±20,0	p ₁₋₄ <0,001 p ₂₋₄ <0,001 p ₃₋₄ <0,001
ТК, нмоль/л	47,2±10,5	50,3±6,2	44,3±6,1	31,02±10,9	
ОДК, нмоль/л	105,0±18,3	97,9±10,6	95,9±12,6	49,75±19,3	p ₁₋₄ <0,05 p ₂₋₄ <0,05 p ₃₋₄ <0,05
ТрК, нмоль/л	2,2±0,3	2,3±0,2	2,1±0,24	1,0±0,4	p ₁₋₄ <0,05 p ₂₋₄ <0,01 p ₃₋₄ <0,05
8-ізопростагландин, пг/мл	386,3±42,2	202,2±84,5	38,8±6,03	30,8±4,0	p ₁₋₂ <0,05 p ₁₋₃ <0,001 p ₁₋₄ <0,001 p ₂₋₃ <0,05 p ₂₋₄ <0,05

5 Як видно з наведених даних середній рівень 8-ізопростагландину у пацієнтів з ЦД 2 типу в поєднанні з НАЖХП склав (386,3±42,2) пг/мл, що вірогідно вище в порівнянні з пацієнтами з ЦД 2 типу без НАЖХП, p<0,05 і в 10 разів вище в порівнянні зі здоровими особами, p<0,001. Також встановлено клінічно менші значення рівня 8-ізопростагландину в групі хворих із ЦД 2 типу в сполученні з НАЖХП на стадії стеатозу на тлі терапії в порівнянні з хворими на ЦД 2 типу, p<0,05.

10 При аналізі інших показників ПОЛ встановлено клінічно більші значення ДК, ОДК і ТРК у всіх групах хворих з ЦД 2 типу порівняно зі здоровими особами.

Проведене дослідження дозволило встановити різний ступінь активності 8-ізопростагландину у хворих на ЦД 2 типу в поєднанні з НАЖХП і без неї, а також у пацієнтів із ЦД 2 типу в поєднанні з НАЖХП на стадії стеатозу, які отримували регулярне курсове лікування гепатопротекторами.

Зазначене підтверджує інформативність визначення рівня 8-ізопростагландину як маркера активності ОС.

20 При встановленні кореляційних зв'язків між 8-ізопростагландином і показниками вуглеводного, ліпідного та білкового обміну встановлений позитивний зв'язок з такими показниками ліпидограми, як загальний холестерин (ЗХС), коефіцієнт атерогенності (КА), тригліцериди (ТГ), холестерин ліпопротеїдів дуже низької щільності (ХС ЛПДНЩ) в групі хворих на ЦД 2 типу з НАЖХП; рівнем ЗХС і холестерину ліпопротеїдів низької щільності (ХС ЛПНЩ) у групі хворих із ЦД 2 типу та НАЖХП на тлі лікування і відсутність даного зв'язку у хворих на ЦД 2 типу без НАЖХП.

25 Отже при середніх значеннях рівня 8-ізопростагландину (386,3±42,2) пг/мл, тобто при рівні 8-ізопростагландину понад 344 пг/мл, встановлюється діагноз НАЖХП із наявністю виражених мезенхімально-запальних процесів у печінці, а при середніх значеннях (202,2±84,5) пг/мл у хворих на ЦД 2 типу патологічні зміни з боку печінки ще відсутні. Середні значення рівня 8-ізопростагландину (38,8±6,03) пг/мл спостерігались у хворих на ЦД 2 типу в сполученні з НАЖХП на стадії стеатозу на тлі регулярної терапії, які приближуються до середніх значень цього параметра у здорових осіб, у яких він склав (30,8±4,0) пг/мл.

Приклад 1.

35 Хворий С., 57 років (історія хвороби № 86013), знаходився на обстеженні та лікуванні в клініці ДУ "ІПЕП ім. В.Я. Данилевського НАМН України" від 23.01.12 г. по 06.02.12 р.

Діагноз: цукровий діабет 2 типу, середнього ступеня тяжкості. Діабето-гіпертонічна ангіопатія сітківки. Птеригіум обох очей. Діабетична дистальна полінейропатія. ІХС: атеросклеротичний кардіосклероз. Гіпертонічна хвороба II ст., другого ступеня, ризик 2-3. СНІІ А ст.

Зріст - 185 см, вага - 130 кг. ІМТ - 38 кг/м², співвідношення обсягу талії до обсягу стегон (ОТ/ОС) - 1,03.

Цукровий діабет діагностований у 2010 році за наявності типових діабетичних скарг. Цукор крові при виявленні захворювання становив 12,0 ммоль/л. Дієти дотримується ситуативно, постійно приймає метформин по 500 мг тричі на добу. Показники вуглеводного обміну на даній схемі пероральної цукорознижуючої терапії - задовільні. При обстеженні в клініці рівень глікемії натще становив 7,46 ммоль/л, постпрандіальної глікемії - 5,76 ммоль/л, рівень глікозильованого гемоглобіну - 5,8 % (при нормі 3,3-5,3 %).

Виявлені суттєві зміни параметрів ліпідного обміну: ЗХС - 6,69 ммоль/л (норма - 3,62-6,2 ммоль/л), β-ліпопротеїди (β-ЛП) - 116 од. (норма - 35-55 од.), білірубін - 11 мкмоль/л (норма 8,55-20,5 мкмоль/л) холестерин ліпопротеїди високої щільності (ХС ЛПВЩ) - 0,62 ммоль/л (норма > 1,0 ммоль/л), ХС ЛПНЩ - 4,39 ммоль/л (норма < 2,5 ммоль/л), ХС ЛПДНЩ - 2,02 ммоль/л (норма < 0,76 ммоль/л), ТГ - 4,5 ммоль/л (норма < 1,7 ммоль/л). КА - 10,3 (норма < 3).

Рівень трансаміназ був підвищений: аспартатамінотрансамінази (АсАт) - 0,79 ммоль/л (норма - 0,1-0,45 ммоль/л) і аланіламінотрансамінази (АлАт) - 1,02 ммоль/л (норма - 0,1-0,68 ммоль/л), коефіцієнт Рітиса - 0,77 (норма > 1,0), тимолова проба - 1,55 од (норма - 0-4 од. дн.), лужна фосфатаза - 1293 (норма - 900-2290). Порушення білкового обміну у вигляді змін наступних показників: загальний білок - 89 г/л (норма - 65-85 г/л), альбумін - 52,63 % (норма - 56-66,8 %), α1-глобулін - 5,26 % (норма - 3,0-5,6 %), α2-глобулін - 8,77 % (норма - 6,5-10,5 %), β-глобулін - 15,29 % (норма - 7,3-12,5 %), γ-глобулін - 18,04 % (норма - 12,8-19,0 %).

Визначали рівень основних продуктів ПОЛ: ДК - 430,92 нмоль/л; ТК - 55,61 нмоль/л, ОДК - 117,79 нмоль/л, ТрК - 2,56 нмоль/л. Рівень 8-ізопростагландину становив 367,6 нг/мл. Таким чином, проаналізувавши зміни з боку ліпідного, білкового та вуглеводного обмінів і визначивши основні показники ПОЛ, рівень 8-ізопростагландину виявлено, що у хворого С. наявні ознаки синдрому цитолізу, порушення ліпідного та білкового обмінів, що підтверджують у обстеженого хворого неалкогольну жирову хворобу печінки на стадії стеатогепатиту, діагностовану також при проведенні УЗД печінки.

Приклад 2.

Хворий К., 36 років (історія хвороби № 82168), знаходився на обстеженні та лікуванні в клініці ДУ "Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського НАМН України" від 31.01.11 по 10.02.11 р.

Діагноз: цукровий діабет 2 типу, середньої тяжкості. Одновузловий зоб І ст., еутиреоз. Ожиріння І ст. Діабетична ангіопатія нижніх кінцівок. Вегето-судинна дистонія по гіпертонічному типу з венозною дисциркуляцією. Ангіопатія сітківки. Діабетичний гепатоз. Гіпертонічна хвороба II ст. СН 0 ст.

Зріст - 187 см, вага - 120 кг. ІМТ - 34,3 кг/м², ОТ/ОС - 1,03.

Цукровий діабет діагностований у 2010 році за наявності типових діабетичних скарг. Цукор крові при виявленні захворювання становив 10,0 ммоль/л. Дієти дотримувалася не постійно, приймав до 2011 року сіофор по 850 мг двічі на добу, з 01.02.2011 р. в комбінації з онглізою 5 мг/добу. Показники вуглеводного обміну на даній схемі пероральної цукорознижуючої терапії - задовільні. При обстеженні в клініці рівень глікемії натще на момент госпіталізації становив 9,44 ммоль/л, постпрандіальної глікемії - 10,6 ммоль/л, рівень глікозильованого гемоглобіну - 6,9 % (при нормі 3,3-5,3 %).

Виявлені зміни параметрів ліпідного обміну: ЗХС - 4,9 ммоль/л (норма - 3,62-6,2 ммоль/л), β-ЛП - 90 од. (норма - 35-55 од.), білірубін - 38,5 мкмоль/л (норма 8,55-20,5 мкмоль/л), ХС ЛПВЩ - 0,97 ммоль/л (норма > 1,0 ммоль/л), ХС ЛПНЩ 2,85 ммоль/л (норма < 2,5 ммоль/л), ХС ЛПДНЩ - 1,25 ммоль/л (норма < 0,76 ммоль/л), ТГ - 2,83 ммоль/л (норма < 1,7 ммоль/л). КА - 4,02 (норма < 3).

Рівень трансаміназ був у нормі: АсАт - 0,45 ммоль/л (норма - 0,1-0,45 ммоль/л) і АлАт - 0,66 ммоль/л (норма - 0,1-0,68 ммоль/л), коефіцієнт Рітиса - 1 (норма > 1,0), тимолова проба - 1,7 од (норма - 0-4 од. дн.). Показники білкового обміну у нормі: загальний білок - 55 г/л (норма - 65-85 г/л), альбумін - 65 % (норма - 56-66,8 %), α1-глобулін - 3,5 % (норма - 3,0-5,6 %), α2-глобулін - 10 % (норма - 6,5-10,5 %), β-глобулін - 10 % (норма - 7,3-12,5 %), γ-глобулін - 12,5 % (норма - 12,8-19,0 %).

Визначали рівень основних продуктів ПОЛ: ДК - 234,08 нмоль/л; ТК - 35,69 нмоль/л, ОДК - 85,07 нмоль/л, ТрК - 1,836 нмоль/л. Рівень 8-ізопростагландину становив 131,3 нг/мл. Таким чином, проаналізувавши зміни з боку ліпідного, білкового та вуглеводного обмінів і визначивши

основні показники ПОЛ, рівень 8-ізопростагландину виявлено, що у хворого К. відсутні прояви мезинхімального запалення печінки.

Таким чином, розроблений спосіб дозволяє використовувати рівень 8-ізопростагландину як надійний біомаркер НАЖХП у хворих на ЦД 2 типу.

5 Джерела інформації:

1. Михальчук, Л.М. Неалкогольна жирова хвороба печінки [Текст] / Л.М. Михальчук, А.С. Єфімов // Междунар. ендокринол. журн. - 2010. - № 2. - С. 1-12.

2. Хворостінка, В.М. Вплив жирової дистрофії печінки в поєднанні з метаболічним синдромом на особливості перебігу ЦД [Текст] / В.М. Хворостінка, А.В. Власенко // Междунар. ендокрин. журн. - 2007. - № 5 (11). - С. 65-70.

3. Day, C.P. Steatohepatitis: A tale of two "hits"? [Text] / C.P. Day, O. F. W. James // Gastroenterology. - 1998. - Vol. 114. - P. 842-45.

4. Garc, M.C. Non-alcoholic steatohepatitis [Text] / M.C. Garc // J. of Gastroenterology and Hepatology. - 2001. - Vol. 24. - P. 395-402.

15 5. Пат. 77475 Україна, МПК G01N 33/00. Спосіб діагностики неалкогольної жирової хвороби печінки у хворих на цукровий діабет 2 типу на тлі ожиріння [Текст] / О.В. Огнева, Л.В. Журавлева (UA); заявник і патентовласник Харківський Національний Медичний Університет (UA). - № u201211057; заявл. 24.09.2012; опубл. 11.02.2013, Бюл. № 3. - 3 с.

20 6. Cracowski, J.L. Isoprostanes: new markers of oxidative stress. Fundamental and clinical aspects [Text] / J.L. Cracowski, F. Stanke-Labesque, G. Bessard // Rev. Med. Interne. - 2000. - Vol. 21. - P. 304-307.

7. Lawson, J.A. Isoprostanes: formation, analysis and use as indices of lipid peroxidation in vivo [Text] / J.A. Lawson, J. Rokach, G.A. FitzGerald // J. Biological Chemistry. - 1999. - Vol. 274. - P. 24441-24444.

25 8. Герасимчук, Н.Н. Уровень 8-изопростана, активность супероксиддисмутазы и каталазы у больных гипертонической болезнью с избыточной массой тела и ожирением [Текст] / Н.Н. Герасимчук, О.Н. Ковалёва, Н.А. Сафаргалина-Корнилова // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. - 2012. - № 11. - С. 33.

30 9. Greco, A. Isoprostanes, novel markers of oxidative injury, help understanding the pathogenesis of neurodegenerative diseases [Text] / A. Greco, L. Mingetti, G. Levi // Neurochem. Res. - 2000. - Vol. 25. - P. 1357-1364.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

35 Спосіб діагностики неалкогольної жирової хвороби печінки у хворих на цукровий діабет 2 типу шляхом визначення функціональних біохімічних показників, який **відрізняється** тим, що вимірюють вміст 8-ізопростагландину в сироватці крові і при його значенні понад 344,1 нг/мл діагностують неалкогольну жиркову хворобу печінки.

Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

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