



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **107521**

(13) **U**

(51) МПК

**G01N 33/50** (2006.01)

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2015 12440**

(22) Дата подання заявки: **16.12.2015**

(24) Дата, з якої є чинними  
права на корисну  
модель: **10.06.2016**

(46) Публікація відомостей  
про видачу патенту: **10.06.2016, Бюл.№ 11**

(72) Винахідник(и):

**Чумак Анатолій Андрійович (UA),  
Носач Олена Василівна (UA),  
Овсяннікова Людмила Михайлівна (UA),  
Саркісова Елеонора Олександрівна (UA),  
Альохіна Світлана Михайлівна (UA),  
Гасанова Олена Володимирівна (UA)**

(73) Власник(и):

**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "НАЦІОНАЛЬНИЙ  
НАУКОВИЙ ЦЕНТР РАДІАЦІЙНОЇ  
МЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ  
МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ",  
вул. Мельникова, 53, м. Київ, 04050 (UA)**

## (54) СПОСІБ ОЦІНКИ РИЗИКУ РОЗВИТКУ СТЕАТОГЕПАТИТУ У ХВОРИХ НА НЕАЛКОГОЛЬНИЙ СТЕАТОГЕПАТОЗ

(57) Реферат:

Спосіб оцінки ризику розвитку стеатогепатиту у хворих на неалкогольний стеатогепатоз включає біохімічне дослідження крові. Оцінку ризику проводять шляхом визначення активності аланінамінотрансферази та гама-глутамінотранспептидази, вмісту дієнових кон'югатів

**UA 107521 U**



Корисна модель належить до галузі медицини, зокрема клінічної біохімії та гастроентерології, і може бути використана для визначення наявності ризику прогресування патологічного процесу у хворих на неалкогольний стеатогепатоз з розвитком стеатогепатиту.

Відомий спосіб діагностики неалкогольного стеатогепатиту [1], що включає ультразвукове дослідження печінки та оцінку її функціонального стану за активністю аланінамінотрансферази, аспартатамінотрансферази. При цьому додатково визначають рівень L-карнітину, гомоцистеїну, інтерлейкіну 6, оксиду азоту, фактору некрозу пухлин в сироватці крові та ТБК-активних метаболітів в плазмі крові хворих. На підставі порівняння результатів лабораторного дослідження пацієнта з даними, отриманими при обстеженні контрольної групи, діагностують наявність неалкогольного стеатогепатиту.

Однак неалкогольний стеатогепатит діагностують лише за наявності змін, що виходять за межі відповідних значень контрольної групи, кожного з восьми досліджуваних показників. Це унеможливує використання способу за відсутності результатів або змін хоча б одного з цих лабораторних тестів.

Найбільш близьким аналогом способу, що заявляється, вибраним як прототип, є спосіб діагностики активності стеатогепатиту у хворих на неалкогольну жирову хворобу печінки [2], при якому проводять біохімічне дослідження крові з наступною оцінкою ступеня фіброзу. Відомий спосіб включає визначення активності гама-глутамілтранспептидази (ГГТП) біохімічним методом та вимірювання контрольованого параметру ультразвукового затухання на апараті FibroScan 502 Touch. Активність стеатогепатиту визначають за результатами розрахунку співвідношення між кількістю норм ГГТП та ступеня стеатозу за даними ультразвукового дослідження.

Проте для його здійснення необхідне застосування спеціалізованого обладнання для проведення ультразвукової еластографії. До того ж при визначенні активності процесу в печінці не враховується перебіг запалення в цілому організмі, що також характеризує патологічний стан у печінці.

В основу корисної моделі поставлено задачу спрощення способу шляхом усунення обмежень щодо необхідності застосування обладнання для ультразвукової еластографії та забезпечення достатньої чутливості та специфічності способу шляхом включення показника, який характеризує стан запального процесу в цілому. Це розширить можливості щодо відбору з числа хворих на стеатогепатоз осіб з ризиком розвитку стеатогепатиту для подальшого обстеження та призначення патогенетично обґрунтованого лікування.

Встановлено, що одним із факторів поступового прогресування неалкогольної жирової хвороби печінки є хронічний системний запальний процес. На сьогодні окреслені два напрями розвитку запального процесу в печінці в залежності від рівня дії етіологічних факторів: 1) запальний процес в печінці ініційований факторами, що впливають безпосередньо на печінкові тканини та викликають їх пошкодження, 2) хронічне запалення в печінці виникає на тлі різноманітних імунodefіцитних станів внаслідок запуску запального процесу факторами, що продукуються у вогнищі хронічної інфекції у віддаленому органі.

Отже оцінка ризику прогресування захворювання у хворих на неалкогольний стеатогепатоз з розвитком стеатогепатиту може бути здійснена на підставі аналізу змін біохімічних показників, що характеризують стан запального процесу в печінці (специфічні показники) та порушення прооксидантно-антиоксидантної рівноваги як складової загальної запальної реакції організму (неспецифічні показники).

Поставлена задача вирішується тим, що у способі діагностики активності стеатогепатиту у хворих на неалкогольну жирову хворобу печінки додатково проводять біохімічне дослідження крові з визначенням активності аланінамінотрансферази (АЛТ) та вмісту дієнових кон'югатів (ДК). Це дозволяє оцінити стан процесів ліпопероксидації як складової загальної запальної реакції, більш точно оцінити перебіг патологічного процесу у печінці та уникнути обмежень щодо необхідності проведення ультразвукової еластографії.

Для розробки способу оцінки ризику розвитку стеатогепатиту у хворих на неалкогольний стеатогепатоз було сформовано групи хворих на неалкогольний стеатогепатоз та стеатогепатит і проаналізовано кореляційні зв'язки між рівнем активності специфічних ферментів (АЛТ і ГГТП) та вмістом продуктів ліпопероксидації (ДК).

Встановлено, що у групі хворих на неалкогольний стеатогепатоз спостерігається пряма кореляція високого рівня між активністю ГГТП і вмістом ДК, тобто існує пропорційність між активацією патологічного процесу у печінці та розвитком оксидативного стресу (табл. 1).

Таблиця 1

Значення коефіцієнтів рангової кореляції Спірмена ( $r_s$ ) між активністю АЛТ, ГГТП та вмістом ДК в крові хворих на неалкогольний стеатогепатоз і неалкогольний стеатогепатит

| Показники  | Хворі на неалкогольний стеатогепатоз (n=29) |       | Хворі на неалкогольний стеатогепатит (n=35) |       |
|------------|---|-------|---|-------|
|            | $r_s$                                       | P     | $r_s$                                       | P     |
| АЛТ і ГГТП | 0,154                                       | 0,212 | 0,439                                       | 0,004 |
| АЛТ і ДК   | -0,056                                      | 0,386 | 0,031                                       | 0,430 |
| ГГТП і ДК  | 0,809                                       | 0,001 | -0,013                                      | 0,471 |

В той час як в групі хворих на неалкогольний стеатогепатит такої кореляції не відмічається, проте наявний позитивний кореляційний зв'язок середнього рівня між активністю АЛТ і ГГТП.

5 При порівнянні груп хворих за рівнем АЛТ, ГГТП та ДК встановлено, що вони достовірно різняться за активністю АЛТ, ГГТП і співвідношенням ГГТП/ДК (табл. 2).

Таблиця 2

Активність АЛТ і ГГТП, вміст ДК та співвідношення між ними в крові хворих на неалкогольний стеатогепатоз та неалкогольний стеатогепатит ( $M \pm m$ , U - тест Манна та Уїтні)

| Група                                       | АЛТ, од./л            | ГГТП, од./л            | ДК, ум. од.            | ГГТП / АЛТ, від. од. | АЛТ/ДК, від. од.      | ГГТП/ДК, від. од.      |
|---|-----------------------|------------------------|------------------------|----------------------|-----------------------|------------------------|
| Хворі на неалкогольний стеатогепатоз (n=29) | 27,48±1,34            | 26,97±4,41             | 1,258±0,204            | 1,01±0,16            | 53,26±5,67            | 27,48±4,22             |
| Хворі на неалкогольний стеатогепатит (n=35) | 61,43±5,63<br>p=0,001 | 52,71±11,00<br>p=0,012 | 1,163±0,088<br>p=0,608 | 1,15±0,34<br>p=0,118 | 32,10±4,46<br>p=0,002 | 69,48±17,80<br>p=0,048 |

10 Для проведення регресійного аналізу було відібрано показники АЛТ, ГГТП, АЛТ / ДК і ГГТП / ДК. За допомогою методу бінарної логістичної регресії здійснено тестування залежності між цими незалежними змінними та змінною "група" і вибрана придатна логістична функція, яка може бути використана для реалізації способу:

$$PR = 6,155 - 0,154 \times \text{АЛТ} - 0,016 \times \text{ГГТП} / \text{ДК}, \text{ де}$$

PR - показник ризику, од.;

6,155 - константа;

0,154 та 0,016 - коефіцієнти логістичної регресії;

АЛТ - активність аланінамінотрансферази, од./л;

ГГТП - активність гама-глутамілтранспептидази, од./л;

ДК - вміст дієнових кон'югатів, од.оп.г./мл.

20 В залежності від додатного або від'ємного значення показника PR, отриманого за результатами аналізу значень біохімічних показників з використанням логістичної функції, є можливим зробити висновок про відсутність або наявності ризику розвитку стеатогепатиту у хворого на стеатогепатоз.

Якість логістичної функції перевірено за допомогою ROC-кривої (Receiver Operator Characteristic), яка демонструє достатньо високу прогностичну силу моделі (фір.).

Запропоновану корисну модель здійснюють наступним чином.

30 У хворого на стеатогепатоз проводять забір крові шляхом венепункції натщесерце. Кров центрифугують для відокремлення сироватки від формених елементів. Активність АЛТ (К.Ф. 2.6.1.2) в сироватці крові визначають відомим колориметричним кінетичним динітрофенілгідразиним методом [3], активність ГГТП (К.Ф. 2.3.2.2) - відомим колориметричним кінетичним методом з використанням субстрату гама-глутаміл-3-карбокси-4-нітроаніліду [4].

Вміст ДК визначають методом, заснованим на спектрофотометричних вимірюваннях оптичної густини екстрагованих ізопропанолом ненасичених ліпідів та продуктів пероксидації ліпідів плазми та еритроцитів периферичної крові. Кров для дослідження отримують натщесерце в присутності ЕДТА в кінцевій концентрації 1 ммоль/мл. 0,5 мл крові екстрагують в 5,0 мл суміші гептан - ізопропанол (1:1 за об'ємом), струшуючи у закритих пробірках протягом 15 хв в шуттель-апараті. Після центрифугування (при 10000 об/хв протягом 10 хв) ліпідні екстракти відокремлюють й розводять у 5,0 мл суміші гептан - ізопропанол (3:7 за об'ємом). До розведених ліпідних витяжок додають 2,0 мл водного розчину хлористоводневої кислоти для розділення фаз і відмивки від неліпідних домішок. Після розділення фаз водно-ізопропанольну фазу відбирають в окрему суху пробірку. Для зневоднення ізопропанольного екстракту додають 1 грам хімічно чистого хлористого натрію. Через 30 хв декантують звільнену від води ізопропанольну фазу. Оптичний контроль з 0,5 мл 0,1 ммоль ЕДТА, розбавленого ізотонічним розчином хлористого натрію, обробляють як і дослідні проби. Спектрофотометрію ізопропанольного екстракту проводять на спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі 232 нм відносно оптичного контролю. Розрахунок проводять за формулою:

$$C = E \times V_{\text{іф}} / V_{\text{кр}}, \text{ де}$$

C - вміст продуктів ПОЛ, од.оп.г./мл;

E - показник екстинкції;

$V_{\text{іф}}$  - об'єм ізопропанольної фази, мл;

$V_{\text{кр}}$  - об'єм крові, мл.

Далі проводять розрахунок умовного кількісного показника ризику за формулою:

$$\text{ПР} = 6,155 - 0,154 \times \text{АЛТ} - 0,016 \times \text{ГГТП} / \text{ДК}, \text{ де}$$

ПР - показник ризику, од.;

6,155 - константа;

0,154 та 0,016 - коефіцієнти логістичної регресії;

АЛТ - активність аланінамінотрансферази, од./л;

ГГТП - активність гама-глутамілтранспептидази, од./л;

ДК - вміст дієнових кон'югатів, од.оп.г./мл.

При від'ємному значенні показника ПР встановлюють наявність ризику розвитку стеатогепатиту у хворого на стеатогепатоз.

Чутливість способу, що характеризує відсоток хворих на стеатогепатит, у яких прогноз здійснився, становить 82,9 %. Специфічність тесту, що характеризує відсоток хворих на стеатогепатоз, у яких прогноз здійснився, складає 86,2 %. Точність здійснення прогнозу за цим способом становить 84,4 %.

Позитивне прогнозоване значення результатів тесту становить 87,9 %, тобто якщо у хворого на стеатогепатоз результати тесту позитивні, то вірогідність того, що він має ризик розвитку стеатогепатиту становить 87,9 %.

Негативне прогнозоване значення результатів тесту становить 80,6 %, тобто, якщо у хворого на стеатогепатоз результати тесту негативні, то вірогідність того, що він не має ризику розвитку стеатогепатиту становить 80,6 %.

Можливість здійснення способу, який заявляється, підтверджується наступними клінічними прикладами.

Прикладі. Хворий Л., 63 роки. При стаціонарному лікуванні в гастроентерологічному відділенні діагностовано наявність стеатогепатозу, хронічного гастродуоденіту та виразкової хвороби дванадцятипалої кишки. В пробі крові рівень активності АЛТ становив 35 од./л, ГГТП - 43 од./л; вміст ДК -0,38 од.оп.г./мл. Розрахований показник ризику ПР мав від'ємне значення і дорівнював "-1,05". Зроблено висновок про наявність у хворого ризику розвитку стеатогепатиту. При подальшому поглибленому лабораторному обстеженні виявлено порушення прооксидантно-антиоксидантної рівноваги з підвищенням рівня ТБК-активних продуктів до 6,23 нмоль/мл (норма 1,58-4,81 нмоль/мл) та зниженням активності супероксиддисмутази до 2,14 од./мг Нb (норма 2,45-6,28 од./мг Нb) та підвищення рівня гепатоспецифічного ферменту треоніндегідратази 51,0 од./мл (К.Ф. 4.2.1.16; норма до 35,5 од./мл). Це є проявом загальної запальної реакції з розвитком оксидативного стресу та локального запального процесу у печінці з вивільненням у системний кровообіг гепатоспецифічного ферменту, тобто підтвердженням наявності ризику прогресування патологічного процесу.

Приклад 2. Хворий А., 60 років. При стаціонарному лікуванні в гастроентерологічному відділенні діагностовано наявність стеатогепатозу та виразкової хвороби дванадцятипалої кишки. В пробі крові рівень активності АЛТ становив 39 од./л, ГГТП-19 од./л; вміст ДК-1,15 од.оп.г./мл. Розрахований показник ризику ПР мав від'ємне значення і дорівнював "-0,12". Зроблено висновок про наявність у хворого ризику розвитку стеатогепатиту. При подальшому

поглибленому лабораторному обстеженні виявлено порушення прооксидантно-антиоксидантної рівноваги з накопиченням продуктів окислювальної модифікації білків (ДНФГ<sub>370</sub> 4,70 од.оп.г./мл, норма 1,21-4,26 од.оп.г./мл; ДНФГ<sub>430</sub> 4,55 од.оп.г./мл, норма 0,61-2,25 од.оп.г./мл), зниженням активності супероксиддисмутази до 1,80 од./мг Нb (норма 2,45-6,28 од./мг Нb). Це є проявом загальної запальної реакції з розвитком оксидативного стресу, що є фактором ризику розвитку стеатогепатиту.

Приклад 3. Хворий К., 53 роки. При стаціонарному лікуванні в гастроентерологічному відділенні діагностовано наявність стеатогепатиту, хронічного некалькульозного холециститу та виразкової хвороби дванадцятипалої кишки. В пробі крові рівень активності АЛТ становив 40 од./л, ГГТП - 84 од./л; вміст ДК - 1,08 од.оп.г./мл. Розрахований показник ризику ПР мав від'ємне значення і дорівнював "-1,25". При подальшому поглибленому лабораторному обстеженні виявлено порушення прооксидантно-антиоксидантної рівноваги з накопиченням продуктів окислювальної модифікації білків (ДНФГ<sub>370</sub> 4,90 од.оп.г./мл, норма 1,21-4,26 од.оп.г./мл) та зниженням активності супероксиддисмутази до 1,80 од./мг Нb (норма 2,45-6,28 од./мг Нb). Це є проявом загальної запальної реакції з розвитком оксидативного стресу, що може мати негативний вплив на перебіг стеатогепатиту.

У порівнянні з прототипом, при використанні у практиці корисної моделі, що заявляється, забезпечується можливість уникнути необхідності застосування спеціалізованого обладнання для проведення ультразвукової еластографії завдяки урахуванню змін показників, які характеризують перебіг як локальної, так і системної запальної реакції. Це, в цілому, дозволяє спростити спосіб при забезпеченні його достатньої чутливості та специфічності щодо виявлення з числа хворих на неалкогольний стеатогепатоз осіб, які мають ризик розвитку стеатогепатиту.

Джерела інформації:

1. Спосіб діагностики неалкогольного стеатогепатиту: пат. 94489 Україна: МПК G01N 33/48 (2006.01) / Звягінцева Т. Д. (UA), Глущенко С. В. (UA); заявник та патентовласник Харківська медична академія післядипломної освіти (UA). - № у 2014 06799; заявл. 16.06.2014; опубл. 10.11.2014, Бюл. № 21.-4 с.

2. Спосіб діагностики активності стеатогепатиту у хворих на неалкогольну жирову хворобу печінки: пат. 95577 Україна: МПК (2014.01) A61B 8/00, G01N 33/48 (2006.01)/ Степанов Ю. М. (UA), Шендрік Л. М. (UA), Ягмур В. Б. (UA), Птушкіна Д. О. (UA); заявники та патентовласники Степанов Ю. М. (UA), Шендрік Л. М. (UA), Ягмур В. Б. (UA), Птушкіна Д. О. (UA). - № у 2014 08238; заявл. 21.07.2014; опубл. 25.12.2014, Бюл. № 24.-3 с.

3. Reitman, S. A Colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases/ S. Reitman, S. Frankel// J. Clin. Path.-1957. - Vol. 28. - P 56-63.

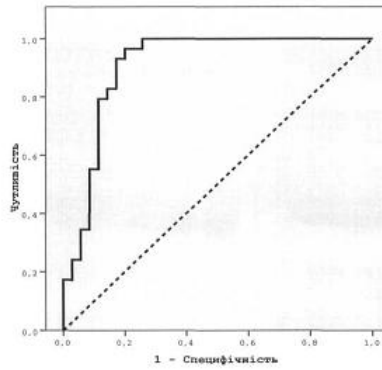
4. Persijn, J. P. A New Method for the Determination of  $\gamma$ -Glutamyltransferase in Serum / J. P. Persijn, W. van der Slik // J. Clin. Chem. Clin. Biochem.-1976. - Vol. 14, № 9. - P. 421-427.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб оцінки ризику розвитку стеатогепатиту у хворих на неалкогольний стеатогепатоз, що включає біохімічне дослідження крові, який **відрізняється** тим, що оцінку ризику проводять шляхом визначення активності аланінамінотрансферази та гамма-глутамінтраспептидази, вмісту дієнових кон'югатів з розрахунком показника ризику за формулою:

$ПР = 6,155 - 0,154 \times АЛТ - 0,016 \times ГГТП / ДК$ ,

де ПР - показник ризику, од.; 6,155 - константа; 0,154 та 0,016 - коефіцієнти логістичної регресії; АЛТ - активність аланінамінотрансферази, од./л; ГГТП - активність гамма-глутамінтраспептидази, од./л; ДК - вміст дієнових кон'югатів, од. оп. г./мл і при від'ємному значенні цього показника встановлюють наявність ризику.



ROC-крива для тесту з оцінки ризику розвитку стеатогепатиту у хворих на неалкогольний стеатогепатоз: — ROC-крива; - - - діагональна референтна лінія

Площа під кривою (Area Under Curve) дорівнює 0,908.

Фіг.

---

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

---

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