



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **120386** (13) **U**
(51) МПК (2017.01)
G01N 33/50 (2006.01)
A61K 31/714 (2006.01)
A61P 1/00

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2017 05274</p> <p>(22) Дата подання заявки: 29.05.2017</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.10.2017</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.10.2017, Бюл.№ 20</p>	<p>(72) Винахідник(и): Кучма Наталія Григорівна (UA), Приступа Людмила Никодимівна (UA), Орловський Віктор Феліксович (UA)</p> <p>(73) Власник(и): СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Римського-Корсакова, 2, м. Суми, 40007 (UA)</p>
--	---

(54) СПОСІБ КОРЕКЦІЇ ГІПЕРГОМОЦИСТЕЇНЕМІЇ У ХВОРИХ НА НЕАЛКОГОЛЬНУ ЖИРОВУ ХВОРОБУ ПЕЧІНКИ

(57) Реферат:

Спосіб корекції гіпергомоцистеїнемії у хворих на неалкогольну жирову хворобу печінки включає призначення фармакологічних засобів, а саме комбінації фолієвої кислоти та вітамінів групи В. При цьому призначення комбінації із фармакологічних засобів для хворих проводять в залежності від їх генетичного поліморфізму, який визначають шляхом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), для чого виконують молекулярно-генетичне тестування ДНК хворих з встановленням генетичних варіантів поліморфного гену метилентетрагідрофолатредуктази (МТГФР) і призначають фолієву кислоту у вигляді таблеток у дозі 1 мг на добу протягом місяця, а як вітаміни групи В використовують вітамін В₁₂ у вигляді внутрішньом'язових ін'єкцій у дозі 200 мкг за схемою: перші два тижні - кожного дня, наступні два тижні - три рази на тиждень також протягом місяця, при цьому, якщо через місяць у хворих відсутній позитивний ефект від лікування, пацієнтам з Т677Т поліморфізмом гена МТГФР дану терапію продовжують щонайменше до трьох місяців.

UA 120386 U

Корисна модель належить до галузі медицини, зокрема до терапії, точніше до гастроентерології, і може використовуватись в комплексній терапії неалкогольної жирової хвороби печінки (НАЖХП).

НАЖХП печінки - це поліетіологічний дифузний дисметаболічний процес, що триває понад 6 місяців та включає жирову дистрофію гепатоцитів із гістіолімфоцитарною інфільтрацією печінкових часточок, гіперплазією перисинусоїдальних зірчастих клітин та фіброзом зі збереженням архітектоники печінки (Concurrence of histologic features of steatohepatitis with other forms of chronic liver disease / fBrunt M.E., Ramrakhiani M.D., Barry G.C. et al. J //Mod. Pathol. - 2003. - Vol. 16. № 1. - P. 49-56.]. Гістологічно НАЖХП характеризується накопиченням в гепатоцитах більш ніж 5 % триацилгліцеридів (ТГ), що в подальшому призводить до прогресування жирової дистрофії та запалення [Inflammation as a potential link between nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance Mohamed Asrih and Francois R. Journayvaz Journal of Endocrinology (2013) 218, R25-R36]. За даними ВООЗ у світі нараховується майже 30 % від загального населення з захворюваннями печінки, це набагато перевищує розповсюдженість ВІЛ, цукрового діабету з захворюваннями печінки, це набагато перевищує НАЖХП в загальній європейській популяції становить 2-44 % та 42,6-69,5 % у людей з цукровим діабетом 2 типу, а у людей з надмірною вагою до 57-74 %. Поширеність НАЖХП в США сягає 46 % дорослого населення, з наявністю неалкогольного стеатогепатиту (НАСГ) у 12,2 %, і знаходиться на третьому місці серед показів до трансплантації печінки [Bellentani S. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease / S. Bellentani F. Scaglioli. M. Marino //Dig. Dis. - 2010. - № 28. - P. 155-161, Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study / C. D. Williams, J. Stengel, M. I. Asike et al // Gastroenterology. - 2011. - Vol. 140 (1). - P. 124-131].

Так як НАЖХП є багатofакторним гетерогенним захворюванням, підходи до її лікування також мають бути різноманітні та включати вплив на множинні патологічні чинники.

На сьогодні особливо ретельно починають досліджуватись поліморфізми генів, асоційованих з ожирінням, інсулінрезистентністю, цукровим діабетом, ішемічною хворобою серця та вплив їх асоціацій на розвиток та прогресування НАЖХП. Знання особливостей генотипу хворих на НАЖХП необхідне для вибору більш оптимального та ефективного методу лікування. Одним з важливих і недостатньо вивчених механізмів розвитку та прогресування НАЖХП є підвищення рівню гомоцистеїну в плазмі крові та причини, що до цього призводять.

Найбільш близьким до розробленого способу є спосіб корекції токсичної дії гомоцистеїну шляхом використання вітамінів групи В у складі препарату "Нейрорубін форте лактаб" та фолієвої кислоти у пацієнтів із серцево-судинними захворюваннями [Пат. № 83970 U UA, МПК (2013.01) А61К 31/00. Опубл. 10.10.2013, Бюл. № 19].

Недоліком цього методу є те, що дана схема лікування включає в себе використання вітамінів групи В та фолієвої кислоти, що може провокувати розвиток небажаних побічних наслідків, а також корекцію гіпергомоцистеїнемії у пацієнтів із серцево-судинними захворюваннями без урахування функціонального стану печінки та генотипу пацієнтів.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити схему лікування гіпергомоцистеїнемії (ГГЦ) у пацієнтів із НАЖХП залежно від С677Т поліморфізму гена метилентетрагідрофолатредуктази (МТГФР). Корекція ГГЦ проводиться в основному у пацієнтів із серцево-судинними захворюваннями та не існує переконливих даних щодо призначення лікування з метою зменшення високих рівнів гомоцистеїну у пацієнтів із НАЖХП, хоча він розглядається як один із важливих факторів розвитку та прогресування стеатозу печінки.

Поставлена задача вирішується тим, що у відомому способі корекції гіпергомоцистеїнемії у хворих на неалкогольну жирову хворобу печінки, що включає призначення фармакологічних засобів для хворих, а саме комбінації фолієвої кислоти та вітамінів групи В, згідно із корисною моделлю, призначення комбінації фармакологічних засобів для хворих проводять в залежності від їх генетичного поліморфізму, який визначають шляхом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), для чого виконують молекулярно-генетичне тестування ДНК хворих з встановленням генетичних варіантів поліморфного гена метилентетрагідрофолатредуктази (МТГФР) і призначають фолієву кислоту у вигляді таблеток у дозі 1 мг на добу протягом місяця, а як вітаміни групи В використовують вітамін В₁₂ у вигляді внутрішньом'язових ін'єкцій у дозі 200 мкг за схемою: перші два тижні - кожного дня, наступні два тижні - три рази на тиждень також протягом місяця, при цьому, якщо через місяць у хворих відсутній позитивний ефект від лікування, пацієнтам з Т677Т поліморфізмом гена МТГФР дану терапію продовжують щонайменше до трьох місяців.

За рахунок того, що вітамін В₁₂ та фолієва кислота відіграють основну роль у метаболізмі гомоцистеїну та утилізації його шляхом реметилування до метіоніну, така комбінація дозволить знизити його концентрацію в організмі та зменшити його токсичний вплив на клітини печінки. МТГФР основний фермент, що регулює реакцію перетворення гомоцистеїну в метіонін, поліморфізм гена, що кодує цей фермент призводить до зменшення активності ензиму від 35 до 70 %. Тому, призначення терапії для корекції ГГЦ слід проводити залежно від генетичного поліморфізму. Зменшення вмісту гомоцистеїну плазми крові позитивно впливає на нормалізацію біохімічних показників та ліпідного профілю у пацієнтів із НАЖХП.

Спосіб виконують наступним чином:

Відповідно до мети даного наукового дослідження пацієнтам із НАЖХП проводять визначення вмісту гомоцистеїну плазми крові методом твердофазного конкурентного хемілюмінесцентного імуноферментного аналізу (ІФА) на імуноферментних аналізаторах "IMMULITEONE, DPA" (США), з використанням реактивів "IMMULITE 1000 Homocysteine".

Визначення алельного поліморфізму проводять шляхом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з детекцією результатів гібридизаційно-флюорисцентним методом в режимі реального часу, зі зняттям кривих плавлення продуктів ампліфікації і алель-специфічних флуоресцентно мічених олігонуклеотидних проб після ПЛР. Для виділення ДНК використовували комплекс реагентів ДНК проба-ГС-ГЕНЕТИКА та ПРОБА-РАПІД-ГЕНЕТИКА (ООО "НПО ДНК-Технология", Росія).

Для корекції гіпергомоцистеїнемії призначають фолієву кислоту у вигляді таблеток у дозі 1 мг на добу протягом місяця, а як вітаміни групи В використовують вітамін В₁₂ у вигляді внутрішньом'язових ін'єкцій у дозі 200 мкг за схемою: перші два тижні - кожного дня, наступні два тижні - три рази на тиждень також протягом місяця, при цьому, якщо через місяць у хворих відсутній позитивний ефект від лікування, пацієнтам з Т677Т поліморфізмом гена МТГФР дану терапію продовжують щонайменше до трьох місяців

Можливість здійснення даної корисної моделі підтверджується клінічним прикладом.

Приклад 1. Хворий С., 59 років, історія хвороби № 6511, 2015 р., був госпіталізований зі скаргами на тяжкість та відчуття дискомфорту в правому підребер'ї, сухість в роті.

Анамнез захворювання: вважає себе хворим близько 5 років, коли почали турбувати болі в правому підребер'ї, сухість в роті, підвищення ваги тіла. При плановому обстеженні було виявлено стеатоз печінки за допомогою ультразвукового методу дослідження. Алкоголь та гепатотоксичні препарати не вживає. В сімейному анамнезі - надмірна вага та артеріальна гіпертензія у обох батьків.

Об'єктивне обстеження: загальний стан відносно задовільний, шкірні покриви звичайного кольору, чисті, сухі. Над легенями везикулярне дихання. Межі відносної серцевої тупості в межах фізіологічної норми. Серцева діяльність ритмічна, тони приглушені. ЧСС 69 уд. за хв. АТ 130/74 мм рт. ст. Периферичні набряки відсутні. При пальпації живіт збільшений за рахунок надлишкової жирової тканини, м'який, безболісний. Печінка збільшена в розмірах, за Курловим 14*13*12.

Вимірюють та оцінюють антропометричні параметри: МТ - 99 кг, зріст - 171 см, ОТ - 120 см, ОС - ПО см, ОТ/ОС - 1,09, ІМТ - 33, 91 кг/м², що перевищує норму та свідчить про ожиріння І ступеня.

Результати гематологічного та біохімічного аналізу: еритроцити - $4,1 \cdot 10^{12}$ /л, Нв - 141 г/л, - лейкоцити - $7,4 \cdot 10^9$ /л, гранулоцити - 66 %, лімфоцити - 32 %, моноцити - 4 %, базофіли - 5 %, еозинофіли - 3 %, ШОЕ -14 мм/годину, АЛТ - 65 Од/л, АСТ-61 Од/л, ЛФ - 265 Од/л, ГГТП - 40 Од/л. Маркери вірусних гепатитів негативні. Показники ліпідного обміну: ЗХС - 6,6 ммоль/л, ТГ - 2,2 ммоль/л, ХС ЛПВЩ - 0,88 ммоль/л, розраховане значення ХС ЛПНЩ - 4,73 ммоль/л, індекс атерогенності (ІА) - 6,5. Гомоцистеїн плазми крові - 20,6 мкмоль/л (норма 5-12 ммоль/л).

Для оцінки генетичних особливостей і виявлення генетичних варіантів поліморфного гена МТГФР методом ПЛР виконують молекулярно-генетичне тестування ДНК хворої. За результатами тестування ДНК, згідно з корисною моделлю, виявлено, що хворий є носієм Т677Т генотипу гена МТГФР і має генетичну схильність до розвитку стеатогепатиту.

Для корекції гіпергомоцистеїнемії в додаток до основної терапії призначають фолієву кислоту 1 мг на добу протягом місяця та вітамін В₁₂ у дозі 200 мкг перші два тижні - кожен день, та наступні два тижні - 3 рази на тиждень.

Через місяць лікування пацієнту повторно визначили біохімічні показники крові та ліпідний профіль: АЛТ - 56 Од/л, АСТ-50 Од/л, ЛФ -265 Од/л, ГГТП - 35 Од/л, ЗХС - 5,9 ммоль/л, ТГ - 1,9 ммоль/л, ХС ЛПВЩ - 0,98 ммоль/л, розраховане значення ХС ЛПНЩ - 4,73 ммоль/л, індекс атерогенності (ІА) - 5,9. Гомоцистеїн плазми крові - 15,5 мкмоль/л.

Висновок: в результаті отриманого лікування вміст гомоцистеїну плазми крові знизився, порівняно з вихідним рівнем, проте не досяг референтних значень, що пов'язано з носійством несприятливого генотипу гена МТГФР. Також під впливом отриманого лікування зменшились показники цитолізу та ліпідного профілю.

5 Рекомендації: враховуючи результати лабораторних аналізів в динаміці продовжити лікування до нормалізації показників гомоцистеїну плазми крові.

Приклад 2. Хвора З., 60 років, історія хвороби № 4552, 2015 р., була госпіталізований зі скаргами на тяжкість в правому підребер'ї, періодичний біль, сухість в роті.

10 Анамнез захворювання: вважає себе хворим близько 7 років, коли почали турбувати болі в правому підребер'ї, сухість в роті. При плановому обстеженні було виявлено стеатоз печінки за допомогою ультразвукового методу дослідження. Алкоголь та гепатотоксичні препарати не вживає. В сімейному анамнезі - надмірна вага та цукровий діабет 2 типу у батька.

15 Об'єктивне обстеження: загальний стан відносно задовільний, шкірні покриви звичайного кольору, чисті, сухі. Над легеньми везикулярне дихання. Межі відносної серцевої тупості в межах фізіологічної норми. Серцева діяльність ритмічна, тони приглушені. ЧСС 74 уд. за хв. АТ 132/74 мм рт. ст. Периферичні набряки відсутні. При пальпації живіт збільшений за рахунок надлишкової жирової тканини, м'який, безболісний. Печінка збільшена в розмірах, за Курловим 15*13*12.

20 Вимірюють та оцінюють антропометричні параметри: МТ - 90 кг, зріст - 164 см, ОТ - 115 см, ОС-109 см, ОТ/ОС - 1,09, ІМТ - 33, 46 кг/м², що перевищує норму та свідчить про ожиріння І ступеня.

25 Результати гематологічного та біохімічного аналізу: еритроцити - $3,8 \cdot 10^{12}$ /л, Нв - 130 г/л, лейкоцити - $7,0 \cdot 10^9$ /л, гранулоцити - 60 %, лімфоцити - 37 %, моноцити - 5 %, базофіли - 5 %, еозинофіли - 3 %, ШОЕ -16 мм/годину, АЛТ - 68 Од/л, АСТ-65 Од/л, ЛФ - 290 Од/л, ГГТП - 42 Од/л. Маркери вірусних гепатитів негативні. Показники ліпідного обміну: ЗХС - 6,4 ммоль/л, ТГ - 2,1 ммоль/л, ХС ЛПВЩ - 0,91 ммоль/л, розраховане значення ХС ЛПНЩ - 4,54 ммоль/л, індекс атерогенності (ІА) - 6,0. Гомоцистеїн плазми крові - 19,3 мкмоль/л (норма 5-12 ммоль/л).

30 Для оцінки генетичних особливостей і виявлення генетичних варіантів поліморфного гена МТГФР методом ПЛР виконують молекулярно-генетичне тестування ДНК хворої. За результатами тестування ДНК, згідно з корисною моделлю, виявлено, що хворий є носієм С677Т генотипу гена МТГФР і має генетичну схильність до розвитку стеатогепатиту.

Для корекції гіпергомоцистеїнемії в додаток до основної терапії призначають фолієву кислоту 1 мг на добу протягом місяця та вітамін В₁₂ у дозі 200 мкг перші два тижні - кожен день, та наступні два тижні - 3 рази на тиждень.

35 Через місяць лікування пацієнту повторно визначили біохімічні показники крові та ліпідний профіль: АЛТ - 40 Од/л, АСТ-38 Од/л, ЛФ -230 Од/л, ГГТП - 30 Од/л, ЗХС - 5,0 ммоль/л, ТГ - 1,6 ммоль/л, ХС ЛПВЩ -1,05ммоль/л, розраховане значення ХС ЛПНЩ - 3,23 ммоль/л, індекс атерогенності (ІА) - 3,8. Гомоцистеїн плазми крові - 10,9 мкмоль/л.

40 Висновок: в результаті отриманого лікування вміст гомоцистеїну плазми крові знизився та досяг референтних значень. Також під впливом отриманого лікування нормалізувались біохімічні показники та показники ліпідного профілю.

Рекомендації: пацієнтці рекомендована подальша гепатопротективна та гіполіпідемічна терапія.

45 Проводили визначення вмісту гомоцистеїну плазми крові та С677Т поліморфізму гена МТГФР у 100 пацієнтів із верифікованою НАЖХП. Діагноз НАЖХП встановлювався на основі адаптованої клінічної настанови, заснованої на доказах "Неалкогольна жирова хвороба печінки" (2014 р.) під редакцією Харченко Н. В. та на підставі комплексної оцінки скарг, даних фізикального обстеження, результатів лабораторних та інструментальних досліджень. Статистичну обробку отриманих результатів проводили згідно із методом варіаційної статистики за допомогою ліцензійної програми SPSS Statistics 21.0

50 Для лікування ГГЦ пацієнтам призначали фолієву кислоту у вигляді таблеток у дозі 1 мг на добу протягом місяця. Вітамін В₁₂ (ціанокобаламін) у дозі 200 мкг призначали пацієнтам внутрішньом'язово за схемою протягом 1 місяця 1 раз на добу - перші 2 тижні, наступні 2 тижні - 3 рази на тиждень.

55 Вміст гомоцистеїну плазми крові до лікування у пацієнтів із НАЖХП з генотипами С677С, С677Т та Т677Т становив $15,7 \pm 2,26$, $19,6 \pm 2,67$ та $24,1 \pm 2,98$ мкмоль/л відповідно ($p < 0,05$). У таблиці представлена динаміка зміни концентрації гомоцистеїну під впливом лікування залежно від С677Т поліморфізму гена МТГФР.

Таблиця 1

Вміст гомоцистеїну залежно від С677Т поліморфізму гена метилентетрагідрофолатредуктази до та після лікування

	Генотип			P
	C/C	C/T	T/T	
	n=46	n=38	n=16	
До лікування	15,7±2,26	19,6±2,67	24,1±2,98	p ₁ <0,001 p ₂ <0,001 p ₃ <0,001
Після лікування	11,1±1,87	13,9±2,17	21,9±3,33	p ₁ <0,001 p ₂ <0,001 p ₃ <0,001
p*	< 0,001	< 0,001	< 0,001	

Примітки:

1. p* - вірогідність, відмінностей показників до та після лікування I та II груп,
2. p1 - вірогідність відмінності показників у хворих із C/C та C/T поліморфізмами,
3. p2 - вірогідність відмінності показників у хворих із C/C та T/T поліморфізмами,
4. p3 - вірогідність відмінності показників у хворих із C/T та T/T поліморфізмами.

В результаті лікування виявили, що гомоцистеїн плазми крові у носіїв С677С та С677Т генотипу зменшився майже на 30 %, а у носіїв Т677Т генотипу на лише на 9,1 %. Отже, додавання фолієвої кислоти в дозі 1 мг на добу та вітаміну В12 в дозі 200 мг протягом 1 місяця зменшує рівень ГГЦ. Пацієнтам, яким протягом чотирьох тижнів не вдалося досягти зниження вмісту гомоцистеїну плазми крові, ми рекомендували продовжувати терапію вітаміном В о та фолієвою кислотою за тотожною схемою ще три місяці.

Технічним результатом, що досягається запропонованим способом є корекція гіпергомоцистеїнемії у пацієнтів з НАЖХП. Запропонована схема лікування є проста в використанні, сприяє покращенню в лікуванні гіпергомоцистеїнемії і може бути застосована лікарями як в поліклінічних так і в стаціонарних медичних закладах. Окрім цього застосування цього способу в медицині може надати позитивний економічний та позитивний ефект у зв'язку з поширеністю НАЖХП серед населення.

15 ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб корекції гіпергомоцистеїнемії у хворих на неалкогольну жирову хворобу печінки, який включає призначення фармакологічних засобів, а саме комбінації фолієвої кислоти та вітамінів групи В, який **відрізняється** тим, що призначення комбінації із фармакологічних засобів для хворих проводять в залежності від їх генетичного поліморфізму, який визначають шляхом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), для чого виконують молекулярно-генетичне тестування ДНК хворих з встановленням генетичних варіантів поліморфного гену метилентетрагідрофолатредуктази (МТГФР) і призначають фолієву кислоту у вигляді таблеток у дозі 1 мг на добу протягом місяця, а як вітаміни групи В використовують вітамін В₁₂ у вигляді внутрішньом'язових ін'єкцій у дозі 200 мкг за схемою: перші два тижні - кожного дня, наступні два тижні - три рази на тиждень також протягом місяця, при цьому, якщо через місяць у хворих відсутній позитивний ефект від лікування, пацієнтам з Т677Т поліморфізмом гена МТГФР дану терапію продовжують щонайменше до трьох місяців.

30

Комп'ютерна верстка О. Гергіль

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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