



МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **120387** (13) **U**
(51) МПК
G01N 33/50 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2017 05275</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 ПРОГНОЗУВАННЯ РОЗВИТКУ НЕАЛКОГОЛЬНОГО СТЕАТОГЕПАТИТУ У ПАЦІЄНТІВ З НЕАЛКОГОЛЬНИМ СТЕАТОЗОМ ПЕЧІНКИ

(57) Реферат:

Спосіб прогнозування розвитку неалкогольного стеатогепатиту у пацієнтів з неалкогольним стеатозом печінки включає проведення молекулярно-генетичного аналізу зразків ДНК за методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з визначенням генетичних варіантів поліморфного гена. Як зразки ДНК для проведення молекулярно-генетичного аналізу використовують поліморфні ДНК-локуси, які виділяють методом ПЛР із цільної крові пацієнта. Визначення генетичних варіантів поліморфного гена проводять шляхом дослідження С677Т поліморфізму гена метилентетрагідрофолатредуктази (МТГФР) і за наявності Т677Т генотипу гена МТГФР у пацієнтів із стеатозом печінки роблять висновок про підвищений ризик розвитку неалкогольного стеатогепатиту.

UA 120387 U

Корисна модель належить до галузі клінічної медицини, а саме до внутрішніх хвороб, гастроентерології та медичної генетики, і може бути використана з метою прогнозування та профілактики неалкогольного стеатогепатиту (НАСГ).

5 Неалкогольна жирова хвороба печінки (НАЖХП) належить до провідних медико-соціальних проблем, що поєднані з високим ризиком розвитку ускладнень та збільшенням кількості непрацездатного населення [Бабак О.Я. Достижения и перспективы гастроэнтерологии / О.Я.Бабак // Сучасна гастроентерологія. - 2009. - №6(50). - С. 6-25].

10 За даними ВООЗ у світі нараховується майже 30 % від пацієнтів із захворюваннями печінки, це набагато перевищує розповсюдженість вірусу імунодефіциту людини, цукрового діабету чи інших хронічних захворювань. Розповсюдженість НАЖХП в загальній європейській популяції становить до 45 %, а у людей з надмірною вагою до 74 %. Поширеність НАЖХП в США сягає 46 % дорослого населення, з наявністю неалкогольного стеатогепатиту - 12,2 % [Targher G. Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes / G. Targher, L Bertolini, R. Padovani//J Hepatol. - 2010. - № 53.- P. 713-718.]. В загальній популяції патологія печінки є лише 13-ю провідною причиною смерті, тоді як у пацієнтів з НАЖХП вона займає 3-є місце, крім того середня тривалість життя хворих на НАЖХП менша, ніж у популяції [Harrison S. A. Orlistat for overweight subjects with nonalcoholic steatohepatitis: a randomized, prospective trial / S. A. Harrison, W. Fecht, E. M. Brunt // Hepatology. - 2009. - Vol. 49. - P. 80-86.]. Передбачуваний спочатку доброякісний перебіг жирової інфільтрації печінки, може в подальшому призвести до розвитку НАСГ та цирозу печінки.

20 Продовжується активне вивчення механізмів розвитку та прогресування НАСГ, досліджують різноманітні фактори, що можуть провокувати перехід НАЖХП в стеатогепатит. Зокрема гомоцистеїн розглядають як провокуючий фактор активації метаболічних змін в печінці та активації запалення. Фермент метилентетрагідрофолатредуктаза (МТГФР) є ключовим у процесі метаболізму гомоцистеїну та перетворення його в метіонін. Генетичні мутації гена, що кодує цей фермент, призводять до зниження його активності від 35 до 70 %.

25 Відомі дослідження [Sazci A. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in patients with nonalcoholic steatohepatitis (NASH) /A. Sazci, E. Ergul, C. Aygun // Cell Biochemistry Function. - 2008. - № 26. - P. 291-296.] виявили вірогідний зв'язок С677Т поліморфізму гена МТГФР із наявністю гіпергомоцистеїнемії та прогресуванням НАЖХП. Інші дослідники [Kasapoglu B. MTHFR 677C/Tand 1298A/C mutations and non-alcoholic fatty liver disease / B. Kasapoglu // Clinical Medicine-2015. - Vol. 15. - P. 248-251.] підтвердили зв'язок С677Т поліморфізму гена МТГФР з прогресуванням НАЖХП та розвитком НАСГ.

30 Відомий спосіб діагностики НАЖХП у хворих на артеріальну гіпертензію (АГ) із супутнім ожирінням залежно від індивідуального гаплотипу, що включає визначення даних антропометрії, змін біохімічного аналізу крові, вуглеводного і ліпідного обміну, рівня адипонектину плазми, даних ультразвукової діагностики (УЗД) печінки. Додатково аналізують I/D поліморфізм гена PPAR- γ 2, плазмовий вміст лептину, причому хворих-носіїв "патологічного" D-алеля гена ACE та ProPro-генотипу гена PPAR- γ 2 у гаплотипі із гіперлептинемією відносять до групи з високою діагностичною точністю проявів НАЖХП у хворих на АГ і абдомінальним ожирінням, що асоціюється з тяжкими клінічними проявами та гіршим прогнозом для здоров'я пацієнта, [патент України на корисну модель № 90195, МПК А61В 10/00, опубл. 12.05.2014, бюл. № 9].

45 Недоліком цього способу є те, що прогнозування розвитку НАЖХП проводять на основі об'єктивних даних наявності несприятливого генотипу поліморфізмів генів, що впливають на розвиток серцево-судинних хвороб, що опосередковано може впливати на патологічні зміни в печінці, а також не враховані основні маркери запалення в печінці.

50 Найбільш близьким до розробленого способу є спосіб генетичної діагностики НАЖХП, при якому прогнозування захворювання проводять на основі дисліпідемії, гіперглікемії, гіперінсулінемії, дослідження функціонального стану печінки та поліморфізму гена адипонектину ADIPOR1 (rs 666089) [патент України на корисну модель № 75197, МПК А61В 8/00, G01N 33/48, опубл. 26.11.2012, бюл. № 22].

55 Недоліком цього методу є те, що в додаток до запропонованого поліморфізму треба вивчати концентрацію адипонектину та визначати рівень інсулінорезистентності, що в кінцевому результаті допоможе оцінити вміст жиру в печінці, але не вирішить питання діагностики різних форм НАЖХП.

60 В основу корисної моделі поставлена задача удосконалення способу прогнозування ризику розвитку НАСГ у пацієнтів із діагностованою НАЖХП шляхом визначення генотипів за С677Т поліморфізмом гена МТГФР, що дозволить більш інформативно та з меншими затратами сформулювати групи високого ризику для того, щоб здійснити заходи профілактики даної патології.

Поставлена задача вирішується тим, що у відомому способі, що включає проведення молекулярно-генетичного аналізу зразків ДНК за методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з визначенням генетичних варіантів поліморфного гена, згідно із корисною моделлю, як зразки ДНК для проведення молекулярно-генетичного аналізу використовують поліморфні ДНК-локуси, які виділяють методом ПЛР з цільної крові пацієнта, причому визначення генетичних варіантів поліморфного гена проводять шляхом дослідження С677Т поліморфізму гена МТГФР I за наявності Т677Т генотипу у пацієнтів із стеатозом печінки роблять висновок про підвищений ризик розвитку неалкогольного стеатогепатиту.

Спосіб виконують наступним чином:

Розвиток НАСГ прогнозують шляхом виділення із цільної крові за допомогою реагенту поліморфних ДНК-локусів методом ПЛР. Для визначення алельного поліморфізму 4 екзону гена МТГФР С677Т (rs1 801133) ампліфікували ділянку промотора вказаного гена за допомогою пари специфічних праймерів: прямого (sense) - 5'

GTCATCCSTATTTGGCAGGTTAC 3' і зворотного (antisense) - 5' CTGAGAGGAGATCTGGGAAGAA 3'. Для виділення ДНК використовували комплекс реагентів ДНК проба-ГС-ГЕНЕТИКА та ПРОБА-РАПИД-ГЕНЕТИКА (ООО "НПО ДНК-Технология", Росія).

Можливість здійснення даної корисної моделі підтверджується клінічним прикладом.

Хвора К., 50 років, історія хвороби № 2367, 2015 р., була госпіталізована зі скаргами на тяжкість та відчуття дискомфорту в правому підребер'ї.

Анамнез захворювання: вважає себе хворою близько 6 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 легеньми везикулярне дихання. Межі відносної серцевої тупості в межах фізіологічної норми. Серцева діяльність ритмічна, тони приглушені. ЧСС 72 уд. за хв. АТ 135/75 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*14*13.

Вимірюють та оцінюють антропометричні параметри: МТ - 95 кг, зріст - 168 см, ОТ - 120 см, °С - 110 см, ОТ/ОС - 1,09, ІМТ - 33,68 кг/м², що перевищує норму та свідчить про ожиріння I ступеню.

Результати гематологічного та біохімічного аналізу: еритроцити - $3.1 \cdot 10^{12}$ /л, Нв - 132 г/л, лейкоцити - $8,2 \cdot 10^9$ /л, гранулоцити - 65 %, лімфоцити - 30 %, моноцити, - 5 %, базофіли - 5 %, еозинофіли - 5 %, ШОЕ - 15 мм/годину, АЛТ - 78 Од/л, АСТ-70 Од/л, ЛФ - 280 Од/л, ГГТП - 35 Од/л. Маркери вірусних гепатитів негативні. Показники ліпідного обміну: ЗХС - 6.2 ммоль/л, ТГ - 1,9 ммрль/л, ХС ЛПВЩ - 0,87 ммоль/л, розраховане значення ХС ЛПНЩ - 4,47 ммоль/л.

Пацієнтці як інструментальний метод, згідно з корисною моделлю, використовують метод ультразвукового дослідження органів черевної порожнини. Виявлена гепатомегалія: товщина правої долі печінки - 14,9 см (норма до 13 см), лівої - 10,0 см (норма до 8,0 см), хвостатої долі 2,5 см, надмірне накопичення жиру в печінці.

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 хвора є носієм Т677Т генотипу гена МТГФР і має генетичну схильність до розвитку стеатогепатиту.

Висновок: на підставі комплексного аналізу взаємозв'язків між досліджуваними показниками та додатковими діагностичними критеріями (наявність Т677Т генотипу гена МТГФР) у хворої встановлений розвиток стеатогепатиту печінки.

Рекомендації: Враховуючи несприятливий генотип гена МТГФР, пацієнтці рекомендована гіполіпідемічна та гепатопротективна терапія. Родичам першого ступеня рекомендовано додаткове молекулярно-генетичне тестування з визначенням генотипу поліморфного гена МТГФР та при необхідності проведення додаткових профілактичних заходів.

Запропонованим методом було проведено обстеження 100 пацієнтів із верифікованим діагнозом НАЖХП, що 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. Про наявність стеатогепатиту у додаток до ультразвукових змін свідчило підвищення активності сироваткових трансаміназ (АЛТ, АСТ) більше ніж у 2 рази.

Основну групу склали 86 пацієнтів із НАСГ та 14 пацієнтів із неалкогольним стеатозом печінки (НАСП).

Статистичну обробку отриманих даних проводили за допомогою програми SPSS Statistics 17.0. Для порівняння розподілення частот генотипів та алелів між групами хворих та контролю використовували критерій χ^2 Пірсона. Про асоціацію генотипів та алелів зі схильністю до захворювань оцінювали за величиною відношення шансів (OR) з 95 % довірчим інтервалом (CI). Статистично достовірними вважали відмінності при $p < 0,05$.

Результати молекулярно-генетичного аналізу поліморфізму С677Т гена МТГФР у досліджуваних групах пацієнтів представлено в таблиці.

Показник	Пацієнти із НАСП n=14		Хворі на НАСГ, n=86	
	n	%	n	%
С677С генотип	11	78,6	35	40,7
С677Т генотип	3	21,4	35	40,7
Т677Т генотип	0	0	16	18,6
С алель		0,89		0,61
Т алель		0,11		0,39
$\chi^2=7,53$				
$p = 0,023$				

Примітки:

n - кількість пацієнтів;

χ^2 - критерій узгодженості Пірсона;

p - показник вірогідності відмінностей

Виявили, що Т-алель зустрічається вірогідно частіше у пацієнтів зі стеатогепатитом ніж у пацієнтів зі стеатозом печінки.

Ризик розвитку НАСГ у носіїв Т667Т генотипу у 6,7 рази вищий, ніж у носіїв С677С генотипу (ВШ= 6,7, 95 % ДІ 1,43-5,29; $p = 0,002$), що свідчить про їх асоціацію із даним захворюванням.

Технічним результатом, що досягається запропонованим способом є прогнозування ризику розвитку НАСГ у осіб, із НАЖХП які мають Т677Т генотипи (Т-алель) гена МТГФР, що дозволяє сформулювати групи ризику щодо розвитку НАСГ. Для таких осіб можна рекомендувати контроль факторів ризику стеатогепатиту, корекцію способу життя шляхом проведення профілактичних заходів, що дозволило б суттєво знизити ризик розвитку НАСГ.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб прогнозування розвитку неалкогольного стеатогепатиту у пацієнтів з неалкогольним стеатозом печінки, що включає проведення молекулярно-генетичного аналізу зразків ДНК за методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з визначенням генетичних варіантів поліморфного гена, який **відрізняється** тим, що як зразки ДНК для проведення молекулярно-генетичного аналізу використовують поліморфні ДНК-локуси, які виділяють методом ПЛР із цільної крові пацієнта, при чому визначення генетичних варіантів поліморфного гена проводять шляхом дослідження С677Т поліморфізму гена метилентетрагідрофолатредуктази (МТГФР) і за наявності Т677Т генотипу гена МТГФР у пацієнтів із стеатозом печінки роблять висновок про підвищений ризик розвитку неалкогольного стеатогепатиту.

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

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