

**ОПИСАНИЕ
ИЗОБРЕТЕНИЯ
К ПАТЕНТУ**

(12)

РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ



НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ
СОБСТВЕННОСТИ

(19) **ВУ** (11) **22942**

(13) **С1**

(46) **2020.04.30**

(51) МПК

A 61B 10/00 (2006.01)

G 01N 33/48 (2006.01)

(54) **СПОСОБ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ
АНТИФИБРОЗНОЙ ТЕРАПИИ ПИРОГЕНАЛОМ ХРОНИЧЕСКОГО
ГЕПАТИТА С**

(21) Номер заявки: а 20170388

(22) 2017.10.16

(43) 2019.06.30

(71) Заявители: Цыркунов Владимир Максимович; Черняк Сергей Александрович; Копыцкий Андрей Витальевич (ВУ)

(72) Авторы: Цыркунов Владимир Максимович; Черняк Сергей Александрович; Копыцкий Андрей Витальевич (ВУ)

(73) Патентообладатели: Цыркунов Владимир Максимович; Черняк Сергей Александрович; Копыцкий Андрей Витальевич (ВУ)

(56) RU 2009497 С1, 1994.
ЧЕРНЯК С.А. и др. Актуальные проблемы медицины. Материалы ежегодной итоговой научно-практической конференции. - Гродно. - 2015. - Ч. 2. - С. 289-291.
SU 971271, 1982.
SU 1404950 А1, 1988.

(57)

Способ прогнозирования эффективности антифиброзной терапии пирогеналом хронического гепатита С, заключающийся в том, что до и через 1 ч после внутримышечного введения пирогенала в дозе 5 мкг натошак определяют сывороточные уровни таурина, гамма-аминомасляной кислоты, лейцина, 3-метокси-4-гидроксифенилгликоля и триптофана, рассчитывают значение пробита z по формуле:

$$z = -0,302 + 4,733 \cdot \Delta\text{Tau} - 0,268 \cdot \Delta\text{GABA} - 5,055 \cdot \Delta\text{Leu} + 0,285 \cdot \Delta\text{MHPG} + 5,474 \cdot \Delta\text{Tpr},$$

где ΔTau - относительное изменение сывороточного уровня таурина,

ΔGABA - относительное изменение сывороточного уровня гамма-аминомасляной кислоты,

ΔLeu - относительное изменение сывороточного уровня лейцина,

ΔMHPG - относительное изменение сывороточного уровня 3-метокси-4-гидроксифенилгликоля,

ΔTpr - относительное изменение сывороточного уровня триптофана,

после чего определяют значение функции нормального стандартного распределения $\Phi(z)$ и при значении $\Phi(z)$ менее 0,4841 прогнозируют эффективность, а при значении $\Phi(z)$, равном 0,4841 или более, - отсутствие эффективности антифиброзной терапии пирогеналом.

Изобретение относится к области медицины, а именно инфектологии, и может использоваться для прогнозирования эффективности антифиброзной терапии пациентов с хроническим гепатитом С (ХГС) бактериальным липополисахаридом (БЛПС) - пирогеналом.

В период безинтерфероновой эры терапии ХГС проблема лечения фиброза печени остается актуальной, в том числе для пациентов с элиминацией вируса гепатита С (ВГС). Установлено, что у пациентов с ХГС, прошедших противовирусную терапию, в том числе

ВУ 22942 С1 2020.04.30

препаратами прямого противовирусного действия, снижение фиброза печени в общей группе с выраженным фиброзом печени было достигнуто у 69 %, в подгруппе с циррозом печени - у 55 % [1].

Известен способ определения индивидуальной чувствительности к пирогедалотерапии, заключающийся в том, что у пациентов с вирусными гепатитами в периферической крови определяют процентное содержание промоноцитов и зрелых моноцитов до введения пирогедала и через 2 ч после введения, и при значении процента прироста этих клеток, равном 16 и более, пирогедалотерапию считают показанной, при значении 10-15 - сомнительной, при 9 и ниже - непоказанной [2].

Недостатком данного способа является то, что прогнозирование ответа на пирогедалотерапию проводилось у пациентов с вирусным гепатитом А, при котором отсутствует хронизация и развитие фиброза, и при гепатите В, при котором не оценивались показатели, характеризующие изменение стадии фиброза в печени на фоне терапии пирогедалом, при гепатите С исследования не проводились.

Из просмотра доступной литературы нам не удалось обнаружить прототип заявляемого изобретения.

Задача изобретения - разработка объективного способа прогнозирования эффективности антифиброзной терапии пирогедалом при ХГС.

Поставленная задача решается тем, что до и через 1 ч после внутримышечного введения пирогедала в дозе 5 мкг натошак определяют сывороточные уровни таурина, гамма-аминомасляной кислоты, лейцина, 3-метокси-4-гидроксифенилгликоля и триптофана, рассчитывают значение пробита z по формуле:

$$z = -0,302 + 4,733 \cdot \Delta\text{Tau} - 0,268 \cdot \Delta\text{GABA} - 5,055 \cdot \Delta\text{Leu} + 0,285 \cdot \Delta\text{MHPG} + 5,474 \cdot \Delta\text{Trp},$$

где ΔTau - относительное изменение сывороточного уровня таурина,

ΔGABA - относительное изменение сывороточного уровня гамма-аминомасляной кислоты,

ΔLeu - относительное изменение сывороточного уровня лейцина,

ΔMHPG - относительное изменение сывороточного уровня 3-метокси-4-гидрокси-фенилгликоля,

ΔTrp - относительное изменение сывороточного уровня триптофана,

после чего определяют значение функции нормального стандартного распределения $\Phi(z)$ и при значении $\Phi(z)$ менее 0,4841 прогнозируют эффективность, а при значении $\Phi(z)$, равном 0,4841 или более, - отсутствие эффективности антифиброзной терапии пирогедалом.

Способ осуществляют следующим образом.

Пациентам с ХГС (стадиями фиброза II-III) после забора 5 мл венозной крови вводят внутримышечно 5 мкг пирогедала и через 1 ч производят повторный забор венозной крови в количестве 5 мл. Две порции крови центрифугируют, полученную сыворотку анализируют методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с последующим определением сывороточного уровня Tau, GABA, Leu, MHPG и Trp.

Далее рассчитывают относительное изменение сывороточного уровня каждой аминокислоты (АК) по формуле:

$$\Delta\text{АК} = \frac{\text{АК}_2 - \text{АК}_1}{\text{АК}_1},$$

где $\Delta\text{АК}$ - относительное изменение сывороточного уровня аминокислоты;

АК_1 - сывороточная концентрация аминокислоты до введения пирогедала;

АК_2 - сывороточная концентрация аминокислоты через 1 ч после введения пирогедала.

Рассчитывают пробит-функцию z , подставляя полученные значения в уравнение:

$$z = -0,302 + 4,733 \cdot \Delta\text{Tau} - 0,268 \cdot \Delta\text{GABA} - 5,055 \cdot \Delta\text{Leu} + 0,285 \cdot \Delta\text{MHPG} + 5,474 \cdot \Delta\text{Trp},$$

где $-0,302$ - свободный член уравнения логистической регрессии;

ΔTau - относительное изменение сывороточного уровня таурина;

ΔGABA - относительное изменение сывороточного уровня гамма-аминомасляной кислоты;

ΔLeu - относительное изменение сывороточного уровня лейцина;

ΔMHPG - относительное изменение сывороточного уровня 3-метокси-4-гидрокси-фенилгликоля;

$\Delta 5\text{Trp}$ - относительное изменение сывороточного уровня триптофана.

4,733, 0,268, 5,055, 0,285, 5,474 - коэффициенты уравнения логистической регрессии для соответствующих аминокислот.

Затем вычисляют значение функции нормального стандартного распределения $\Phi(z)$, и если это значение менее 0,4841, прогнозируют эффективность антифиброзной терапии пирогеналом, если же значение $\Phi(z)$ равно или более 0,4841 - отсутствие эффективности.

Здесь Φ - функция нормального стандартного распределения, 0,4841 - пороговая вероятность. Для вычисления значения Φ используют таблицу значений функции нормального стандартного распределения (табл. 1) [3]. В случае если полученное значение z является отрицательной величиной, производят вычитание Φ от единицы.

Приводим доказательства возможности осуществления изобретения.

Прогнозирование успешности лечения производится на основании уравнения логистической регрессии с бинарным откликом с пробит-функцией связи. Данное уравнение получено в рамках обобщенной линейной модели на основании исследования, в котором участвовали 36 пациентов без сопутствующей патологии, у которых после проведения курса интерферонотерапии стандартными или пегилированными интерферонами в комбинации с рибавирином (согласно протоколу) развился рецидив ХГС (появление и увеличение концентрации в крови РНК HCV, активация показателя цитолиза гепатоцитов - АлАТ, наличие фиброза II-III стадии). Средний возраст обследованных составил 40,5 лет.

Пациентам с антифиброзной целью внутримышечно вводился пирогенал [4]. Для оценки степени выраженности фиброза печени в динамике до начала терапии пирогеналом и после окончания курса терапии определялся сывороточный уровень тканевого ингибитора матриксной металлопротеиназы -1 (ТИМП-1) - специфического неинвазивного маркера фиброза печени [5].

У пациентов натощак забирали 5 мл венозной крови, после чего вводили внутримышечно 5 мкг пирогенала и через 1 ч производили повторный забор венозной крови в количестве 5 мл, с последующим центрифугированием. В полученной сыворотке методом ВЭЖХ определяли сывороточные уровни Tau, GABA, Leu, MHPG и Trp. На основании полученных значений сывороточных уровней АК и ТИМП-1 была построена обобщенная линейная модель логистической регрессии прогнозирования эффективности антифиброзной терапии ХГС с бинарным откликом с пробит-функцией связи. Таким образом, оценки коэффициентов уравнения регрессии и свободного члена уравнения регрессии установлены авторами опытным путем. Для построения модели использовался специализированный язык программирования "R" версии 3.4.1, в качестве интегрированной среды разработки использовалась среда "RStudio" версии 1.0.143 [6]. Построение обобщенной линейной модели с бинарным откликом выполнялось с помощью пакета "stats" [7]. ROC-анализ выполнялся с помощью пакета "ROCR", кросс-валидация модели выполнялась с помощью пакета "boot" [8, 9].

Все указанные в формуле оценки коэффициентов регрессии при предикторах являются статистически значимыми ($p < 0,05$ для всех описанных оценок). Факторы инфляции дисперсии для всех предикторов остаются менее 5, что позволяет считать влияние мультиколлинеарности на оценки параметров бинарной регрессии несущественным. Информационный критерий Акаике для данной модели $AIC = 35,66$, для нуль-модели $AIC_0 = 49,09$, остаточный девианс модели 23,66 (для нуль модели - 47,09), таким образом, псевдо- $R^2 = 0,5$. Это позволяет заключить, что, с точки зрения математических допущений к модели, она является адекватной. Точность прогноза для данной модели составляет 0,806, чувствительность - 0,6923, специфичность - 0,8696 (при пороге отсечения 0,4841).

Дополнительно были проведены ROC-анализ модели (фиг. 1) и кросс-валидация модели методом скользящего контроля (в качестве функции цены была выбрана точность

BY 22942 C1 2020.04.30

предсказания) (фиг. 2). Площадь под ROC-кривой составляет $AUC = 0,913$, что свидетельствует о хорошей предсказательной способности модели [10]. Средняя точность предсказания составила 0,75.

В таблице представлены значения функции нормального стандартного распределения.

Таблица значений функции нормального стандартного распределения

Z	Сотые									
	0.00	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09
0.0	0.5000	0.5040	0.5080	0.5120	0.5160	0.5199	0.5239	0.5279	0.5319	0.5359
0.1	0.5398	0.5438	0.5478	0.5517	0.5557	0.5596	0.5636	0.5675	0.5714	0.5753
0.2	0.5793	0.5832	0.5871	0.5910	0.5948	0.5987	0.6026	0.6064	0.6103	0.6141
0.3	0.6179	0.6217	0.6255	0.6293	0.6331	0.6368	0.6406	0.6443	0.6480	0.6517
0.4	0.6554	0.6591	0.6628	0.6664	0.6700	0.6736	0.6772	0.6808	0.6844	0.6879
0.5	0.6915	0.6950	0.6985	0.7019	0.7054	0.7088	0.7123	0.7157	0.7190	0.7224
0.6	0.7257	0.7291	0.7324	0.7357	0.7389	0.7422	0.7454	0.7486	0.7517	0.7549
0.7	0.7580	0.7611	0.7642	0.7673	0.7704	0.7734	0.7764	0.7794	0.7823	0.7852
0.8	0.7881	0.7910	0.7939	0.7967	0.7995	0.8023	0.8051	0.8078	0.8106	0.8133
0.9	0.8159	0.8186	0.8212	0.8238	0.8264	0.8289	0.8315	0.8340	0.8365	0.8389
1.0	0.8413	0.8438	0.8461	0.8485	0.8508	0.8531	0.8554	0.8577	0.8599	0.8621
1.1	0.8643	0.8665	0.8686	0.8708	0.8729	0.8749	0.8770	0.8790	0.8810	0.8830
1.2	0.8849	0.8869	0.8888	0.8907	0.8925	0.8944	0.8962	0.8980	0.8997	0.9015
1.3	0.9032	0.9049	0.9066	0.9082	0.9099	0.9115	0.9131	0.9147	0.9162	0.9177
1.4	0.9192	0.9207	0.9222	0.9236	0.9251	0.9265	0.9279	0.9292	0.9306	0.9319
1.5	0.9332	0.9345	0.9357	0.9370	0.9382	0.9394	0.9406	0.9418	0.9429	0.9441
1.6	0.9452	0.9463	0.9474	0.9484	0.9495	0.9505	0.9515	0.9525	0.9535	0.9545
1.7	0.9554	0.9564	0.9573	0.9582	0.9591	0.9599	0.9608	0.9616	0.9625	0.9633
1.8	0.9641	0.9649	0.9656	0.9664	0.9671	0.9678	0.9686	0.9693	0.9699	0.9706
1.9	0.9713	0.9719	0.9726	0.9732	0.9738	0.9744	0.9750	0.9756	0.9761	0.9767
2.0	0.9772	0.9778	0.9783	0.9788	0.9793	0.9798	0.9803	0.9808	0.9812	0.9817
2.1	0.9821	0.9826	0.9830	0.9834	0.9838	0.9842	0.9846	0.9850	0.9854	0.9857
2.2	0.9861	0.9864	0.9868	0.9871	0.9875	0.9878	0.9881	0.9884	0.9887	0.9890
2.3	0.9893	0.9896	0.9898	0.9901	0.9904	0.9906	0.9909	0.9911	0.9913	0.9916
2.4	0.9918	0.9920	0.9922	0.9925	0.9927	0.9929	0.9931	0.9932	0.9934	0.9936
2.5	0.9938	0.9940	0.9941	0.9943	0.9945	0.9946	0.9948	0.9949	0.9951	0.9952
2.6	0.9953	0.9955	0.9956	0.9957	0.9959	0.9960	0.9961	0.9962	0.9963	0.9964
2.7	0.9965	0.9966	0.9967	0.9968	0.9969	0.9970	0.9971	0.9972	0.9973	0.9974
2.8	0.9974	0.9975	0.9976	0.9977	0.9977	0.9978	0.9979	0.9979	0.9980	0.9981
2.9	0.9981	0.9982	0.9982	0.9983	0.9984	0.9984	0.9985	0.9985	0.9986	0.9986
3.0	0.9987	0.9987	0.9987	0.9988	0.9988	0.9989	0.9989	0.9989	0.9990	0.9990
3.1	0.9990	0.9991	0.9991	0.9991	0.9992	0.9992	0.9992	0.9992	0.9993	0.9993
3.2	0.9993	0.9993	0.9994	0.9994	0.9994	0.9994	0.9994	0.9995	0.9995	0.9995
3.3	0.9995	0.9995	0.9995	0.9996	0.9996	0.9996	0.9996	0.9996	0.9996	0.9997
3.4	0.9997	0.9997	0.9997	0.9997	0.9997	0.9997	0.9997	0.9997	0.9997	0.9998
3.5	0.9998	0.9998	0.9998	0.9998	0.9998	0.9998	0.9998	0.9998	0.9998	0.9998
3.6	0.9998	0.9998	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999
3.7	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999
3.8	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999
3.9	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
...
∞	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000

На фиг. 1 представлена ROC-кривая для модели логистической регрессии прогнозирования эффективности антифиброзной терапии ХГС.

На фиг. 2 представлен график точности классификации при различных порогах отсечения.

Приводим конкретные примеры, подтверждающие эффективность использования предлагаемого способа.

Пример 1.

Пациент Л., 35 лет, мужчина, стаж ХГС 11 лет, получал стандартный интерферон альфа 2b в течение 9 месяцев. РНК ВГС определялась в крови, фиброз II стадии. Перед стартом антифиброзной терапии пациенту была проведена проба с пирогеналом. Сывороточный уровень аминокислот имел следующие значения до и после введения пирогенала: Tau - 160,1 и 65,96 нг/мл, GABA - 1,08 и 0,7 нг/мл, Leu - 247,99 и 146,45 нг/мл, MHPG - 5,135 и 2,185 нг/мл, Tgr - 81,93 и 81,65 нг/мл соответственно.

При использовании данных величин уровней аминокислот в расчете модели прогнозирования эффективности антифиброзной терапии получаем значение пробита $z = -1,104$. Далее для вычисления Φ используем таблицу значений функции нормального стандартного распределения и, так как значение пробита отрицательное, рассчитываем $\Phi = 1 - 0,8643 = 0,13 < 0,4841$, что свидетельствует о благоприятном прогнозе для проведения антифиброзной терапии. В течение года пациенту Л. были проведены три курса терапии пирогеналом. Уровень ТИМП-1 снизился на 12,1 % (с 268,99 до 236,42 нг/мл), что свидетельствовало об отсутствии прогрессирования фиброза.

Пример 2.

Пациент М., 38 лет, женщина, стаж ХГС 3 года, получала стандартный интерферон альфа 2b в течение 9 месяцев. РНК ВГС определялась в крови, фиброз II стадии. Перед стартом антифиброзной терапии пациенту была проведена проба с пирогеналом. Сывороточный уровень аминокислот имел следующие значения до и после введения пирогенала: Tau - 129,5 и 108,8 нг/мл, GABA - 2,16 и 1,32 нг/мл, Leu - 152,2 и 118,9 нг/мл, MHPG - 1,86 и 1,65 нг/мл, Tgr - 59,6 и 70,75 нг/мл соответственно.

Используя данные величины уровней аминокислот, вычисляем значение пробита $z = 1,15$, по таблице значений функции нормального стандартного распределения вычисляем $\Phi = 0,87 > 0,4841$, что свидетельствует о неблагоприятном прогнозе для проведения антифиброзной терапии. В течение 6 месяцев пациентке М. были проведены два курса терапии пирогеналом. Уровень ТИМП-1 повысился на 23,5 % (с 190,29 до 235,04 нг/мл), что свидетельствовало о прогрессировании фиброза в печени.

Таким образом, предлагаемый способ может использоваться для прогнозирования эффективности антифиброзной терапии.

Источники информации:

1. Crissien A.M. et al. Regression of advanced fibrosis or cirrhosis measured by elastography in patients with chronic hepatitis C who achieve sustained virologic response after treatment for HCV // *Hepatology*. - 2015. - Vol. 62. - No. 1. - P. 264-265.

2. Патент RU 2009497, 1994.

3. Большев Л.Н., Смирнов Н.В. Таблицы математической статистики. - М.: Наука. Главная редакция физико-математической литературы, 1983. - С. 112-118.

4. Цыркунов В.М. и др. Влияние бактериального липополисахарида-пирогенала на регресс фиброза в печени при хроническом гепатите С // *Рецепт*. - 2015. - № 6. - С. 45-53.

5. Liu T. et al. Molecular serum markers of liver fibrosis // *Biomark Insights*. - 2012. - Vol. 7. - P. 105-117.

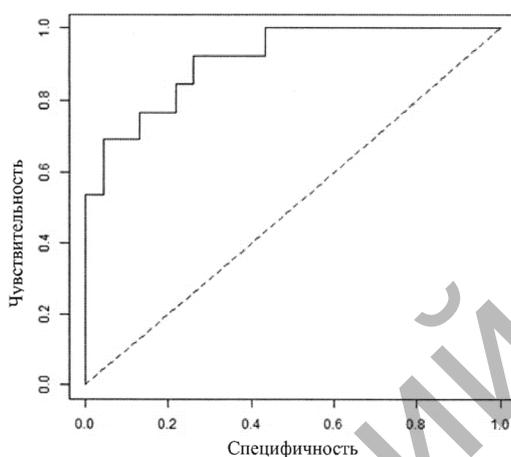
6. RStudio Team. RStudio: Integrated Development for R [Electronic resource] / RStudio Team // RStudio, Inc. - Boston, MA, 2016. - Mode of access: <http://www.rstudio.com> - Date of access: 04.07.2017.

7. Мастицкий С.Э., Шитиков В.К. Статистический анализ и визуализация данных с помощью R. Черно-белое издание. - М.: ДМК Пресс, 2015. - С. 8-22.

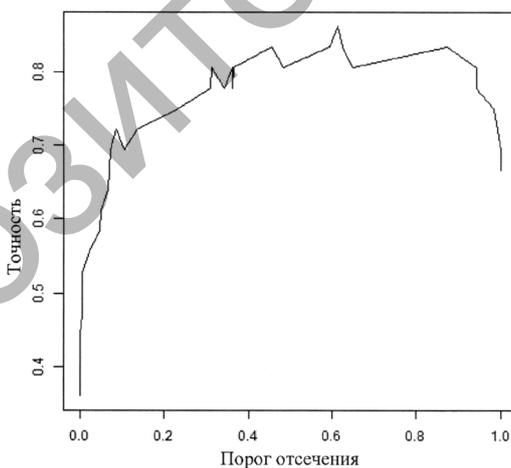
8. Sing T., Sander O., Beerenwinkel N., Lengauer T. ROCr: visualizing classifier performance in R // Bioinformatics. - 2005. - Vol. 21. - No. 20. - P. 3940-3941.

9. Canty A., Ripley B. boot: Bootstrap R (S-Plus) Functions. R package version 1.3-19 [Electronic resource] // Mode of access: <https://cran.r-project.org/web/packages/boot/index.html/>. - Date of access: 04.07.2017.

10. Pannal P., Marshall W., Labor A., Magid E. A strategy to promote the rational use of laboratory tests // Clinica Chimica Acta. - 1996. - Vol. 244. - P. 121-127.



Фиг. 1



Фиг. 2