

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 035598

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.07.14

(51) Int. Cl. *A61B 10/00* (2006.01)
C12Q 1/6827 (2018.01)

(21) Номер заявки
201800061

(22) Дата подачи заявки
2017.12.04

(54) СПОСОБ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ВЕРОЯТНОСТИ РАЗВИТИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПОРАЖЕНИЯ ПЕЧЕНИ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ АНТИРЕТРОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

(43) 2019.06.28

(56) RU-C2-2426492
US-A1-20070134709
US-A1-20170159107

(96) 2017/ЕА/0095 (ВУ) 2017.12.04

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
"ГРОДНЕНСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ";
КУРБАТ МИХАИЛ НИКОЛАЕВИЧ
(ВУ)

(72) Изобретатель:
Курбат Михаил Николаевич,
Цыркунов Владимир Максимович
(ВУ)

(57) Изобретение относится к медицине, клинической лабораторной диагностике. Сущность способа заключается в определении у пациента генотипа полиморфизма С677Т (Ala222Val) гена MTHFR, и при наличии генотипа СТ прогнозируют высокую вероятность развития лекарственного поражения печени.

035598

B1

035598

B1

Изобретение относится к медицине, клинической лабораторной диагностике и может быть использовано для прогнозирования лекарственного поражения печени (ЛПП) при терапии ВИЧ-инфекции.

В настоящее время активно изучается роль генетических факторов, влияющих на эффективность фармакотерапии и развитие побочных эффектов. По имеющимся в литературе сведениям ЛПП встречаются в общей медицинской практике с частотой, как минимум, 1 случай на 1000 пролеченных пациентов, что составляет 10% всех побочных реакций лекарственных средств (ЛС) [1, 2]. Поиск критериев прогнозирования развития ЛПП позволит существенно снизить затраты на терапию и повысить качество жизни пациентов, находящейся на ней.

Известен способ диагностики токсического поражения печени, состоящий в гистологическом исследовании биоптата печени [3].

Недостатками аналога являются диагностика не лекарственного, а алкогольного поражения печени, инвазивность (травматичность); наличие противопоказаний для выполнения; сложность и многоэтапность технического исполнения, субъективность трактовки; использование многих реактивов; не обеспечивает прогноз развития ЛПП.

Также известен способ ранней диагностики токсических поражений печени путем определения активности аланиновой (АЛТ) и аспарагиновой (АСТ) трансаминаз сыворотки крови, отличающийся тем, что при возрастании их уровня в сравнении с нормой на 50% и более судят о наиболее ранних признаках токсического поражения печени [4].

Недостатками этого аналога являются диагностическая, а не прогностическая направленность способа; диагностическая неточность в связи с изменениями вышеуказанных показателей и при других поражениях печени.

Известен способ прогнозирования развития токсического гепатита при химиотерапии множественной миеломы, который заключается в выделении ДНК из лимфоцитов периферической венозной крови методом фенольно-хлороформной экстракции, проведении генотипирования полиморфизма промоторной области гена CYP1A1 в сайте - Ile 462 Val методом полимеразной цепной реакции синтеза ДНК с последующей рестрикцией. При выявлении генотипа Ile-Val прогнозируют высокий риск развития токсического лекарственного гепатита [5].

Ключевым недостатком данного способа является то, что он не позволяет диагностировать поражения гепатоцитов, не связанные с нарушением трансформации ксенобиотиков с помощью системы микросомального окисления, одним из ферментов которого является цитохром P₄₅₀ 1A1, и не может использоваться для оценки риска ЛПП при АРТ.

Из просмотра доступной литературы нам не удалось обнаружить источник, который может быть выбран в качестве прототипа.

Задача изобретения - разработка способа прогнозирования риска развития ЛПП у ВИЧ-инфицированных пациентов, находящихся на длительной антиретровирусной терапии.

Поставленная задача решается путем определения у пациента, находящегося на АРТ, генотипа полиморфизма C677T (Ala222Val) гена MTHFR, и при наличии генотипа СТ прогнозируют высокую вероятность развития лекарственного поражения печени.

Способ осуществляют следующим образом. У пациента с ВИЧ-инфекцией выделяют из лейкоцитов цельной крови ДНК. С образцом выделенной ДНК параллельно проводят две реакции амплификации - с двумя парами аллель-специфичных праймеров для гена MTHFR, ответственного за синтез фермента метилентетрагидрофолатредуктазы, полиморфизм C677T (Ala222Val) и последующим методом детекции продуктов амплификации (флуоресцентной схемой детекции продуктов в режиме реального времени (Real Time) либо с электрофоретической схемой детекции). При наличии генотипа СТ прогнозируют высокую вероятность развития лекарственного поражения печени.

Данные генетические показатели выбраны на основании проведенных клинических исследований на 91 пациенте с диагнозом ВИЧ-инфекции, подтвержденным стандартными лабораторными методами (ИФА, иммунный блоттинг, ПЦР), находящихся на АРТ, согласно клиническим протоколам лечения [6].

У всех пациентов общепринятыми методами на автоматическом биохимическом анализаторе в плазме крови определяли уровень общего билирубина, активность аланина-минотрансферазы (АлАТ), аспартатаминотрансферазы (АсАТ), гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТП) и щелочной фосфатазы (ЩФ).

Диагностика ЛПП у пациентов проведена в соответствие с международными критериями гепатотоксичности Национального института изучения рака (National Cancer Institute Cancer Therapy Evaluation Program: Common Toxicity Criteria. Veers. 2.0. 1999) [7].

При превышении верхней границы нормы хотя бы одного из вышеуказанных показателей у пациента диагностировали гепатотоксичность. В соответствии с наличием или отсутствием признаков ЛПП пациенты были разделены на две группы: первая без ЛПП (без признаков гепатотоксичности) и вторая с ЛПП (наличием гепатотоксичности).

Для проведения аллельной дискриминации указанного маркера применяли систему реагентов производства "Синтол". Амплификацию ДНК проводили на амплификаторе Rotor Gene-Q ("Qiagen", Германия).

Анализ исследуемых полиморфных вариантов изучаемых генов метилентетрагидрофолатредуктазы в исследуемой выборке (рассчитанный с помощью он-лайн калькулятора <http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml>) показал соответствие наблюдаемого распределения генотипов для всех изученных вариантов гена ожидаемому при равновесии Харди-Вайнберга ($\chi^2=0,13$, $p>0,05$). Такое равновесие указывало на то, что на генетическую структуру популяции по изучаемым полиморфизмам не оказывали влияния различные воздействия (не действует отбор, не идет мутационный процесс, отсутствует обмен особями с другими популяциями, не происходит дрейф генов, все скрещивания случайны).

Полученные наблюдаемые частоты генотипов MTHFR, полиморфизм C677T (Ala222Val) приведены в табл. 1.

Таблица 1. Частота выявления генотипов MTHFR (полиморфизм C677T (Ala222Val)) с учетом гепатотоксичности

Генотип	Гепатотоксичность		Достоверность (df=1)
	нет	есть	
СС	0,61	0,46	$\chi^2 = 1,502$, $p>0,05$
СТ	0,22	0,50	$\chi^2 = 4,510$, $p<0,05$
ТТ	0,17	0,04	$\chi^2 = 0,065$, $p>0,05$
Аллель С	0,72	0,71	$\chi^2 = 0,022$, $p>0,05$
Аллель Т	0,28	0,29	

Примечания: * - χ^2 с поправкой Йейтса,

** - χ^2 , рассчитанный с применением точного критерия Фишера.

Как видно из приведенной табл. 1, частота встречаемости генотипа СТ в 2,3 выше у пациентов с лабораторными признаками гепатотоксичности, развившейся на фоне АРТ.

Затем для генотипа СТ рассчитали отношение шансов развития гепатотоксичности в сравниваемых 1 и 2 группах (с 95% доверительным интервалом). Результаты кросс-табуляции для генотипа СТ представлены в табл. 2.

Таблица 2. Показатели сопряженности генотипа СТ

Показатель	Фактор риска есть	Фактор риска отсутствует	Всего
Исход есть	34	34	68
Исхода нет	5	18	23
Всего	39	52	91

Сведения, представленные в табл. 2, позволили рассчитать относительный шанс развития ЛПП в изучаемых группах (табл. 3).

Таблица 3. Расчет шансов развития ЛПП

Статистический показатель	Значение
Шанс найти фактор риска в основной группе	1,000
Шанс найти фактор риска в контрольной группе	0,278
Отношение шансов (OR)	3,600
Стандартная ошибка отношения шансов (S)	0,561
Нижняя граница 95% ДИ (CI)	1,200
Верхняя граница 95% ДИ (CI)	10,804

Как видно из табл. 3, при наличии у пациентов генотипа СТ гена MTHFR C677T (Ala222Val) относительный шанс развития ЛПП составляет 3,6 (95% ДИ 1,20-10,80).

Соответственно носительство генотипа СТ MTHFR C677T (Ala222Val) является прогностически неблагоприятным в плане развития ЛПП при АРТ ВИЧ-инфекции.

В качестве иллюстрации приводим примеры конкретных клинических наблюдений.

Пример 1. Пациент Ю. 1986 год рождения. Год постановки на учет по поводу ВИЧ-инфекции - декабрь 2014 года. Диагноз: ВИЧ инфекция, 2 клиническая стадия (CD4 - 393 кл/мкл). ПГЛ. Потеря массы тела до 10%. (преСПИД). С 08.12.14 назначена АРТ (зидовудин/ламивудин+эфавир). 14.04.15 смена схемы АРТ на тенофовир/эмтрицитабин 300/200 мг по 1 табл. 1 раз в сутки; эфавир в связи с плохой переносимостью заменен на невирапин 200 мг по 1 табл. 1 раз в сутки (2 недели), затем по 1 табл. 2 раза в сутки. Биохимический анализ крови при назначении АРТ (08.12.2014): общий билирубин - 12,9 мкмоль/л, активность АсАТ 34 Ед/л, АлАТ 28 Ед/л, ЩФ 99 Ед/л, ГГТП 27 Ед/л; ИФА HBsAg, antiHCV - отриц. Биохимический анализ крови (19.03.2015): общий билирубин - 14,6 мкмоль/л, активность АсАТ 29,4 Ед/л, АлАТ 56,8 Ед/л, ЩФ 149,8 Ед/л, ГГТП 32,9 Ед/л.

Определен генотип MTHFR C677T (Ala222Val) - СТ. Прогнозировался высокий риск ЛПП. В настоящее время - хроническое ЛПП 1 степени.

Пример 2. Пациент Я. 1981 г.р. ВИЧ-инфекция, 2 клиническая стадия (CD4 - 1369 кл/мкл). ПГЛ.

Рецидивирующая герпетическая инфекция. Новообразования на левом плече и бедре. Саркома Капоши? (преСПИД). Постановка на учет по поводу ВИЧ-инфекции - 2003 г. Дата назначения АРТ (зидовудин /ламивудин 300 мг/150 мг по 1 табл. 2 раза в сутки, абакавир 300 мг 1 табл. 2 раза в сутки): 03.06.2006. Отмечается высокая приверженность к АРТ. Объективный осмотр: жалоб нет. Объективно: пониженное питание. На левом плече выступающее над поверхностью кожи образование размером 1,5×2 см с нечеткими контурами, неоднородного коричнево-синего цвета, при пальпации плотное, безболезненное. Аналогичное образование 1×1,5 см на задней поверхности левого бедра, над коленом. Пальпируются углочелюстные и заднешейные лимфоузлы. Дыхание в легких везикулярное. Сердечные тоны ритмичные, ясные. Живот мягкий безболезненный. Печень не увеличена. Биохимический анализ крови: общий билирубин - 9,7 мкмоль/л, активность АСТ 20 Ед/л, АЛТ 12 Ед/л, ЩФ 65 Ед/л, ГГТП 14 Ед/л; HBsAg, anti-HCV - отриц. Выявлен генотип CC MTHFR C677T (Ala222Val), соответственно ЛПП не прогнозируется. Заключение: несмотря на прием АРТ более 10 лет, признаки ЛПП отсутствуют.

Преимущество заявляемого способа прогнозирования ЛПП заключается в наличии высокой специфичности, ускорении выполнения способа и незначительных материальных затратах в связи с возможностью проведения исследования во всех районных стационарах, обеспеченных в настоящее время ПЦР-лабораториями для диагностики возбудителей инфекционных заболеваний.

Литература.

1. Хазанов А.И. Особенности лекарственных и вирусно-лекарственных поражений печени/ А.И. Хазанов [и др.]// Кремлевская медицина. - 2000. - № 1. - С. 44-47.
2. Identification of metabolites, clinical chemistry markers and transcripts associated with hepatotoxicity/ A. Bunes [et al.]//PLoSOne. - 2014. - Vol. 16, N. 9(5). - e97249.
3. Шерлок Ш. Заболевания печени и желчных путей/ Ш. Шерлок, Дж. Дули -М: ГЭОТАР, 1999-Стр. 40.
4. Галимова, С.Ф. Лекарственные поражения печени. Часть 1/ С.Ф. Галимова// Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. - 2012 - №3 - С. 45.
5. Патент RU № 2283494, опубл. 10.09.2006.
6. Метод оптимизации обследования и проведения антиретровирусной терапии у взрослых и подростков/ И.А. Карпов [и др.]// Инструкция по применению Министерства здравоохранения Республики Беларусь. - Минск, 2012. -С.13-35.
7. Бабанина Н.В. Опыт применения гепатопротектора "Гептор" (адеметеонин) у онкологических пациентов, получающих противоопухолевое лечение/ Н.В. Бабанина// Медиаль. - 2013, - № 2,- С. 59-61.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ прогнозирования вероятности развития лекарственного поражения печени при проведении антиретровирусной терапии ВИЧ-инфекции, заключающийся в том, что у пациента определяют генотип полиморфизма C677T (Ala222Val) гена MTHFR и при наличии генотипа СТ прогнозируют высокую вероятность развития лекарственного поражения печени.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2