



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/50 (2021.02); C12Q 1/6806 (2021.02); C12Q 1/6876 (2021.02)

(21)(22) Заявка: 2020140729, 09.12.2020

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
09.12.2020

Дата регистрации:
30.06.2021

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 09.12.2020

(45) Опубликовано: 30.06.2021 Бюл. № 19

Адрес для переписки:

450106, г. Уфа, ул. Ст. Кувыкина, 94, ФБУН
"Уфимский НИИ медицины труда и экологии
человека"

(72) Автор(ы):

Каримов Денис Олегович (RU),
Бакиров Ахат Бариевич (RU),
Репина Эльвира Фаридовна (RU),
Якупова Татьяна Георгиевна (RU),
Валова Яна Валерьевна (RU),
Хуснутдинова Надежда Юрьевна (RU),
Байгильдин Самат Сагадатович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное бюджетное учреждение науки
"УФИМСКИЙ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ МЕДИЦИНЫ ТРУДА И
ЭКОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2283494 C1, 10.09.2006. RU
2018845 C1, 30.08.1994. ВАЛОВА Я.В. и др.
Анализ экспрессии гена RIPK1 при
индуцированном остром токсическом гепатите
у крыс. Современные проблемы
эпидемиологии, микробиологии и гигиены:
материалы X Всероссийской науч.-практ.
конф. молодых ученых и специалистов
Роспотребнадзора / под ред. д-ра мед. наук,
проф. А.Ю. (см. прод.)

(54) СПОСОБ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ ОСТРОГО ТОКСИЧЕСКОГО
ГЕПАТИТА

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины, в частности к токсикологии, и предназначено для прогнозирования степени тяжести острого токсического гепатита. Осуществляют выделение РНК гена RIPK1 из лимфоцитов периферической венозной крови. Проводят выделение, нормализацию количества РНК до эндогенного контроля GAPDH. Проводят количественный анализ РНК гена RIPK1 и статистический анализ

экспрессии гена RIPK1. При кратности экспрессии гена RIPK1 относительно экспрессии GAPDH от -10 до -5,1 прогнозируют легкую степень тяжести острого токсического гепатита. При кратности от -5,0 до 0 прогнозируют среднюю степень тяжести. При кратности от 0,1 до 10 прогнозируют тяжелую степень тяжести. Изобретение обеспечивает повышение точности прогноза. 9 пр.

(56) (продолжение):

Поповой и академика РАН В.Н. Ракитского, Москва, 24-26 октября 2018 г. - М.: "Русский Печатный Двор". 2018; С.135-136. FILLIOL A. et al. RIPK1 protects hepatocytes from Kupffer cells-mediated TNF-induced apoptosis in mouse models of PAMP-induced hepatitis. J Hepatol. 2017 Jun; 66(6): 1205-1213.

R U 2 7 5 0 6 6 3 C 1

R U 2 7 5 0 6 6 3 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
G01N 33/50 (2006.01)
C12Q 1/6806 (2018.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

G01N 33/50 (2021.02); C12Q 1/6806 (2021.02); C12Q 1/6876 (2021.02)(21)(22) Application: **2020140729, 09.12.2020**

(24) Effective date for property rights:
09.12.2020

Registration date:
30.06.2021

Priority:

(22) Date of filing: **09.12.2020**(45) Date of publication: **30.06.2021 Bull. № 19**

Mail address:

**450106, g. Ufa, ul. St. Kuvykina, 94, FBUN
"Ufimskij NII meditsiny truda i ekologii
cheloveka"**

(72) Inventor(s):

**Karimov Denis Olegovich (RU),
Bakirov Akhat Barievich (RU),
Repina Elvira Faridovna (RU),
Yakupova Tatyana Georgievna (RU),
Valova Yana Valerevna (RU),
Khusnutdinova Nadezhda Yurevna (RU),
Bajgildin Samat Sagadatovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe byudzhethnoe uchrezhdenie nauki
"UFIMSKIY NAUCHNO-ISSLEDOVATELSKIY
INSTITUT MEDITSINY TRUDA I EKOLOGII
CHELOVEKA" (RU)**

(54) METHOD FOR PREDICTING THE SEVERITY OF ACUTE TOXIC HEPATITIS

(57) Abstract:

FIELD: medicine, toxicology in particular.

SUBSTANCE: invention relates to the field of medicine, in particular to toxicology, and is intended to predict the severity of acute toxic hepatitis. The RNA of the RIPK1 gene is extracted from peripheral venous blood lymphocytes. Extraction and normalization of the amount of RNA to endogenous GAPDH control are performed. Quantitative analysis of RAP1 gene RNA and statistical analysis of RUNX1 gene expression are

performed. With a multiplicity of RUNX1 gene expression relative to GAPDH expression from -10 to -5.1, mild severity of acute toxic hepatitis is predicted. With a multiplicity from -5.0 to 0, average severity is predicted. With a multiplicity of 0.1 to 10, a high degree of severity is predicted.

EFFECT: invention provides an increase in the accuracy of the forecast.

1 cl, 9 ex

Изобретение относится к медицине, а именно к токсикологии, и может быть использовано для прогнозирования степени тяжести острого токсического гепатита.

Острый токсический гепатит - это заболевание печени, вызванное однократным воздействием химических веществ или лекарств или чрезмерным употреблением
5 алкоголя. В зависимости от степени тяжести сильно варьируется исход заболевания. Крайне важно определить более точные маркеры степени тяжести острого токсического гепатита для своевременного выбора подходящей терапии.

RIPK1 - рецептор, взаимодействующий с треонинкиназой 1. Этот белок играет роль в воспалении и гибели клеток в ответ на повреждение тканей, распознавание патогенов.
10 Некроз, опосредованный киназой RIPK1, называется некроптозом. Взаимодействующая с рецептором протеинкиназа 1 (RIPK1) является ключевым белком, регулирующим передачу сигналов в клетку. Клинические исследования подчеркнули решающую роль фактора некроза опухолей - α (TNF- α) в некоторых заболеваниях печени. Действительно, уровни TNF- α в сыворотке повышаются у пациентов с фульминантной печеночной
15 недостаточностью, что коррелирует с плохим прогнозом. TNF- α является основным провоспалительным цитокином, большая часть его биологической активности связана с передачей сигналов к рецептору TNFR1. После TNFR1 связывается с RIPK1, функционируя как сигнальный узел, управляющий выживанием клеток. Функция RIPK1 является решающей для гомеостаза и жизнеспособности [Filliol A, Piquet-Pellorce C, Le
20 Seyec J, et al. RIPK1 protects from TNF- α -mediated liver damage during hepatitis. Cell Death Dis. 2016;7(11):e2462. Published 2016 Nov 10. doi: 10.1038/cddis.2016.362].

Известен способ диагностики гепатита на основе измерения интенсивности хемилюминесценции лимфоцитов периферической крови обследуемого в присутствии
25 антигена в 2 и более раза диагностируют гепатит [авторское свидетельство SU 1711076, 1992]. Существенным недостатком этого способа является необходимость наличия в клинике печеночного антигена.

Известен способ прогнозирования течения диффузных заболеваний печени, характеризующийся тем, что методом лазерной доплерографии оценивают
30 микроциркуляторное русло до и после расширенной холодовой пробы. Оценку микроциркуляторного звена проводят в области thenar и hypothenar обеих рук. Вычисляют показатель прироста перфузии AP по формуле: $\Delta P = (P_1 - P) / P \times 100\%$, где P - значение перфузии до проведения холодовой пробы, P₁ значение перфузии после проведения
35 холодовой пробы. При $\Delta P > 10\%$ прогнозируют благоприятное течение заболевания и низкую вероятность перехода в декомпенсированную форму заболевания в течение 12 месяцев. При $\Delta P < 10\%$ прогнозируют неблагоприятное течение с высокой вероятностью декомпенсации [патент RU 2565845, 2015].

Известен способ прогнозирования течения хронического гепатита С 1 генотипа у
40 нелеченных больных с высокой вирусной нагрузкой, заключающийся в том, что в нейтрофилах и моноцитах периферической крови определяют активность цитохимических ферментов сукцинатдегидрогеназы (СДГ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ) и никотинамидадениндинуклеотида (НАД). При снижении активности, по сравнению с нормальными показателями, в нейтрофилах
45 - СДГ и НАД более чем в два раза, ЛДГ и Г-6-ФДГ более чем в три раза, в моноцитах - снижении активности СДГ, ЛДГ, Г-6-ФДГ более чем в два раза и НАД более чем в два раза прогнозируют неблагоприятное течение [патент RU 2657586, 2018].

Наиболее близким аналогом изобретения является способ прогнозирования развития токсического гепатита при химиотерапии множественной миеломы, заключающийся

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

5 высокий риск развития токсического лекарственного гепатита [патент RU 2283494, 2006]. Недостатком прототипа является отсутствие критериев тяжести острого токсического гепатита.

Задачей изобретения является разработка способа прогноза степени тяжести острого токсического гепатита.

10 Техническим результатом изобретения является повышение точности прогноза за счет получения критериев степени тяжести острого токсического гепатита.

Предлагаемый способ прогнозирования степени тяжести острого токсического гепатита осуществляется следующим образом. Проводят выделение РНК и количественный анализ РНК гена RIPK1. Образцы РНК выделяют из лимфоцитов

15 периферической венозной крови. Целостность РНК оценивают электрофорезом в 1%-ном агарозном геле по соотношению интенсивностей полос в геле, соответствующих 28S и 18S рРНК. Синтез первой цепи кДНК проводят с помощью реакции обратной транскрипции. Для изучения количества РНК гена RIPK1 проводят ПЦР со специфичными праймерами, затем нормализацию количества РНК до эндогенного

20 контроля GAPDH. GAPDH - ген «домашнего хозяйства», необходим для нормализации данных количественной экспрессии. После проводят количественный анализ РНК гена RIPK1 с использованием специфичных TaqMan зондов. Затем проводят статистический анализ экспрессии гена RIPK1. При кратности экспрессии гена RIPK1 относительно экспрессии GAPDH от -10 до -5,1 прогнозируют легкую степень тяжести острого

25 токсического гепатита, при кратности от -5,0 до 0 - среднюю степень тяжести, при кратности от 0,1 до 10 прогнозируют тяжелую степень тяжести.

Было проведено исследование по предлагаемому способу 184 больных, из них 75 пациентов были с легкой степенью тяжести острого токсического гепатита, 63 пациента со средней степенью тяжести, 46 пациентов с тяжелой степенью тяжести заболевания.

30 Диагноз острого токсического гепатита устанавливался на основании общепринятых критериев в соответствии с МКБ 10. Кратность экспрессии гена RIPK1 относительно экспрессии GAPDH в группе с легкой степенью тяжести заболевания составляла от -10 до -5,1, у пациентов со средней степенью тяжести кратность экспрессии составляла от -5,0 до 0, у больных с тяжелой степенью тяжести. кратность экспрессии - от 0 до 10.

35 Различия кратности экспрессии гена RIPK1 относительно экспрессии GAPDH статистически значимо различались в группах острого токсического гепатита с различной степенью тяжести заболевания ($F=7,120$, $p=0,004$).

Сущность изобретения поясняется следующими клиническими примерами.

Пример 1

40 Больной Ю., 1982 года рождения, поступил в приемное отделение больницы скорой медицинской помощи. Диагноз: отравление неизвестным веществом. С целью определения дальнейшей тактики лечения необходимо определить прогноз тяжести заболевания. При молекулярно-генетическом тестировании у больного было взято 8 мл венозной крови, провели ПЦР со специфичными праймерами, затем нормализацию

45 количества РНК до эндогенного контроля GAPDH. После провели количественный анализ РНК гена RIPK1 и статистический анализ экспрессии гена RIPK1 с использованием специфичных TaqMan зондов.

Кратность экспрессии гена RIPK1 составила -10. Прогнозируют острый токсический

гепатит легкой степени тяжести. На 5 день заболевания у больного наблюдается общая слабость, по данным морфологического исследования печени наблюдается единичная инфильтрация лимфоцитами. По данным ультразвукового исследования - повышение эхогенности.

5 Пример 2

Больной А., 1986 года рождения, поступил в стационар без сознания в остром периоде отравления тетрахлорметаном. При молекулярно-генетическом тестировании у больного было взято 8 мл венозной крови, провели ПЦР со специфичными праймерами, затем нормализацию количества РНК до эндогенного контроля GAPDH. После провели
10 количественный анализ РНК гена RIPK1 и статистический анализ экспрессии гена RIPK1 с использованием специфичных TaqMan зондов. Кратность экспрессии гена RIPK1 составила -5,1. Прогнозируют острый токсический гепатит легкой степени тяжести. На 5 день заболевания у больного наблюдается общая слабость, астения. По данным морфологического исследования печени наблюдается единичная инфильтрация
15 лимфоцитами, застой крови в сосудах. По данным ультразвукового исследования - повышение эхогенности.

Пример 3

Больной К., 1974 года рождения, поступил в стационар после отравления суррогатами алкоголя. При молекулярно-генетическом тестировании у больного было взято 8 мл
20 венозной крови, провели ПЦР со специфичными праймерами, затем нормализацию количества РНК до эндогенного контроля GAPDH. После провели количественный анализ РНК гена RIPK1 и статистический анализ экспрессии гена RIPK1 с использованием специфичных TaqMan зондов. Кратность экспрессии гена RIPK1 составила -7,3. Прогнозируют острый токсический гепатит легкой степени тяжести. На 5 день
25 заболевания у больного наблюдается удовлетворительное состояние. По данным морфологического исследования печени наблюдается единичная инфильтрация лимфоцитами, застой крови в сосудах, явления холестаза. По данным ультразвукового исследования - повышение эхогенности.

Пример 4

30 Больная О., 1987 года рождения, поступила в стационар. В анамнезе прием парацетамола 4 г, и употребления алкогольных напитков. При молекулярно-генетическом тестировании у больного было взято 8 мл венозной крови, провели ПЦР со специфичными праймерами, затем нормализацию количества РНК до эндогенного контроля GAPDH. После провели количественный анализ РНК гена RIPK1 и
35 статистический анализ экспрессии гена RIPK1 с использованием специфичных TaqMan зондов. Кратность экспрессии гена RIPK1 составила -5,0. Прогнозируют острый токсический гепатит средней степени тяжести. На 5 день заболевания у больного наблюдается состояние средней тяжести, сильная слабость. По данным морфологического исследования печени наблюдается инфильтрация лимфоцитами,
40 участки некроза. По данным ультразвукового исследования - повышение эхогенности, гепатомегалия.

Пример 5

Больной Д., 1988 года рождения, поступил в приемное отделение больницы скорой медицинской помощи. В анамнезе случайное употребление внутрь ацетона. С целью
45 определения дальнейшей тактики лечения необходимо сделать прогноз тяжести заболевания. При молекулярно-генетическом тестировании у больного было взято 8 мл венозной крови, провели ПЦР со специфичными праймерами, затем нормализацию количества РНК до эндогенного контроля GAPDH. После провели количественный

анализ РНК гена RIPK1 и статистический анализ экспрессии гена RIPK1 с использованием специфичных TaqMan зондов. Кратность экспрессии гена RIPK1 составила -3,5. Прогнозируют, острый токсический гепатит средней степени тяжести. На 5 день заболевания у больного наблюдается состояние средней тяжести, сильная слабость, апатия. По данным морфологического исследования печени наблюдается инфильтрация лимфоцитами, участки некроза, признаки холестаза. По данным ультразвукового исследования - повышение эхогенности, гепатомегалия.

Пример 6

Больная И., 1963 года рождения, поступила в стационар в остром периоде токсического отравления неизвестным веществом. При молекулярно-генетическом тестировании у больного было взято 8 мл венозной крови, провели ПЦР со специфичными праймерами, затем нормализацию количества РНК до эндогенного контроля GAPDH. После провели количественный анализ РНК гена RIPK1 и статистический анализ экспрессии гена RIPK1 с использованием специфичных TaqMan зондов. Кратность экспрессии гена RIPK1 составила 0. Прогнозируют острый токсический гепатит средней степени тяжести. На 5 день заболевания у больного наблюдается состояние средней тяжести, сильная слабость, отсутствие аппетита. По данным морфологического исследования печени наблюдается инфильтрация лимфоцитами, участки некроза, признаки застоя в портальном тракте. По данным ультразвукового исследования - повышение эхогенности, гепатомегалия.

Пример 7

Больной А., 1989 года рождения, поступил в стационар в остром периоде после приема внутрь 30 грамм снотворного. Уровень сознания - оглушение. Речевой контакт затруднен. Отмечается парез взора. Грубый гемипарез. При молекулярно-генетическом тестировании у больного было взято 8 мл венозной крови, провели ПЦР со специфичными праймерами, затем нормализацию количества РНК до эндогенного контроля GAPDH. После провели количественный анализ РНК гена RIPK1 и статистический анализ экспрессии гена RIPK1 с использованием специфичных TaqMan зондов. Кратность экспрессии гена RIPK1 составила 0,1. Прогнозируют острый токсический гепатит тяжелой степени. На 5 день заболевания больной находится в тяжелом состоянии. По данным морфологического исследования печени большие участки некроза, признаки застоя в портальном тракте. По данным ультразвукового исследования -повышение эхогенности, гепатомегалия.

Пример 8

Больная А., 1979 года рождения, поступила в стационар в остром периоде токсического гепатита. Со слов родственников было отравление при употреблении грибов. Уровень сознания - ступор. Речь - сенсомоторная афазия. Отмечается парез взора. При молекулярно-генетическом тестировании у больного было взято 8 мл венозной крови, провели ПЦР со специфичными праймерами, затем нормализацию количества РНК до эндогенного контроля GAPDH. После провели количественный анализ РНК гена RIPK1 и статистический анализ экспрессии гена RIPK1 с использованием специфичных TaqMan зондов. Кратность экспрессии гена RIPK1 составила 5,7. Прогнозируют острый токсический гепатит тяжелой степени. На 5 день заболевания пациент находится в тяжелом состоянии, сознание замутнено. По данным морфологического исследования печени большие участки некроза, признаки застоя в портальном тракте. По данным ультразвукового исследования - повышение эхогенности, гепатомегалия.

Пример 9

Больная В., 1957 года рождения, поступила в стационар после введение внутривенно неизвестного вещества. Сознания нет. При молекулярно-генетическом тестировании у больного было взято 8 мл венозной крови, провели ПЦР со специфичными праймерами, затем нормализацию количества РНК до эндогенного контроля GAPDH.

После провели количественный анализ РНК гена RIPK1 и статистический анализ экспрессии гена RIPK1 с использованием специфичных TaqMan зондов. Кратность экспрессии гена RIPK1 составила 10,0. Прогнозируют острый токсический гепатит тяжелой степени. На 5 день заболевания пациент находится в тяжелом состоянии, сознания нет, производится искусственная вентиляция легких. По данным морфологического исследования печени обширные участки некроза, признаки застоя в портальном тракте. По данным ультразвукового исследования -повышение эхогенности, гепатомегалия.

(57) Формула изобретения

Способ прогнозирования степени тяжести острого токсического гепатита, включающий выделение нуклеиновых кислот из лимфоцитов периферической венозной крови, проведение полимеразной цепной реакции, отличающийся тем, что проводят выделение РНК гена RIPK1, нормализацию количества РНК до эндогенного контроля GAPDH, затем проводят количественный анализ РНК гена RIPK1 и статистический анализ экспрессии гена RIPK1, и при кратности экспрессии гена RIPK1 относительно экспрессии GAPDH от -10 до -5,1 прогнозируют легкую степень тяжести острого токсического гепатита, при кратности от -5,0 до 0 - среднюю степень тяжести, при кратности от 0,1 до 10 прогнозируют тяжелую степень тяжести.