



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: 2020140727, 09.12.2020

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
09.12.2020Дата 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),
Хуснутдинова Надежда Юрьевна (RU),
Байгильдин Самат Сагадатович (RU),
Якупова Татьяна Георгиевна (RU),
Валова Яна Валерьевна (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: SU 1397834 A1, 23.05.1988. RU
2392857 C1, 27.06.2010. NUNES DOS SANTOS
K. et al. Polymorphism in the Promoter Region
of NFE2L2 Gene Is a Genetic Marker of
Susceptibility to Cirrhosis Associated with Alcohol
Abuse. Int J Mol Sci. 2019 Jul 23; 20 (14): 3589.
URIBARRENA R. et al. Significance of the
enzymatic changes in alcoholic hepato- paties,
(см. прод.)

(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭТИОЛОГИИ ОСТРОГО ТОКСИЧЕСКОГО ГЕПАТИТА

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины, в частности к токсикологии, и предназначено для определения этиологии острого токсического гепатита. Проводят выделение РНК гена NFE2L2 из лимфоцитов периферической венозной крови, нормализацию количества РНК до эндогенного контроля GAPDH. Проводят количественный анализ РНК гена NFE2L2 и статистический анализ экспрессии гена NFE2L2. При кратности экспрессии гена NFE2L2 относительно экспрессии

GAPDH от -10 до 0 диагностируют острый токсический гепатит, вызванный отравлением этанолом. При кратности экспрессии от 0,1 до 10 диагностируют острый токсический гепатит, вызванный отравлением химическими веществами или лекарствами. Изобретение обеспечивает повышение точности диагностики за счет получения этиологических критериев острого токсического гепатита на ранних стадиях развития заболевания. 6 пр.

(56) (продолжение):

Rev. Esp. Enf. Ap. Digest. 1981; 59: 689-696.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

G01N 33/50 (2021.02); C12Q 1/6806 (2021.02); C12Q 1/6876 (2021.02)(21)(22) Application: **2020140727, 09.12.2020**(24) Effective date for property rights:
09.12.2020Registration 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),
Khusnutdinova Nadezhda Yurevna (RU),
Bajgildin Samat Sagadatovich (RU),
Yakupova Tatyana Georgievna (RU),
Valova Yana Valerevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe byudzhethnoe uchrezhdenie nauki
"UFIMSKIY NAUCHNO-ISSLEDOVATELSKIY
INSTITUT MEDITSINY TRUDA I EKOLOGII
CHELOVEKA" (RU)**(54) **METHOD FOR DETERMINING THE ETIOLOGY OF ACUTE TOXIC HEPATITIS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, toxicology in particular.

SUBSTANCE: invention relates to medicine, in particular to toxicology, and is intended to determine the etiology of acute toxic hepatitis. RNA of the NFE2L2 gene is extracted from peripheral venous blood lymphocytes, and the amount of RNA is normalized to endogenous GAPDH control. Quantitative analysis of the RNA of the NFE2L2 gene and statistical analysis of the expression of the NFE2L2 gene are performed. When the multiplicity of the expression of the NFE2L2

gene relative to the expression of GAPDH is from -10 to 0, acute toxic hepatitis caused by ethanol poisoning is diagnosed. With the multiplicity of expression is from 0.1 to 10, acute toxic hepatitis caused by poisoning with chemicals or drugs is diagnosed.

EFFECT: invention provides an increase in the accuracy of diagnosis by obtaining etiological criteria for acute toxic hepatitis in the early stages of the development of the disease.

1 cl, 6 ex

RU 2 750 659 C1

RU 2 750 659 C1

Изобретение относится к медицине, а именно, к токсикологии, может быть использовано для определения этиологии острого токсического гепатита.

Острый токсический гепатит развивается при попадании в организм токсических веществ (ксенобиотиков), что приводит к развитию стеатоза и стеатогепатита.

5 Нераспознанным стеатозом печени обусловлены 60-80% случаев цирроза неясной этиологии. Наряду с химическими веществами, оказывающими токсическое действие на ткань печени, основное, особое место занимают алкоголь и лекарственные средства, с которыми человек контактирует гораздо чаще, чем с химическими агентами.

10 Морфологических критериев диагностики токсического агента нет. Во всех случаях обнаруживают различной степени выраженный стеатоз, фиброз, очаговые некрозы, тельца Маллори, холестаза, - зависящие от длительности действия токсического вещества, его количества и его физикохимических свойств.

Для проведения этиотропного лечения необходимо определение отравляющего вещества, что не всегда доступно в условиях стационара. В зависимости от механизма 15 повреждения гепатоцитов различают две формы:

1. Химические и лекарственные препараты вызывают: перекисное окисление липидов, денатурацию белков и активное свободнорадикальное повреждение органоидов клетки.

2. Этанол: характерно жировое перерождение печени, обусловленное тем, что алкоголь нарушает синтез жирных кислот в гепатоцитах, а также приводит к 20 преобладанию эффекта фактора некроза опухоли над адипонектином. В результате происходит накопление жира (триглицеридов) в гепатоцитах. Могут наблюдаться явления транзиторного некроза гепатоцитов.

Ядерный фактор NFE2L2 - это фактор транскрипции, который является членом небольшого семейства белков основной лейциновой молнии (bZIP). Кодированный фактор 25 транскрипции регулирует гены, которые содержат элементы антиоксидантного ответа (ARE) в своих промоторах; многие из этих генов кодируют белки, участвующие в реакции на повреждение и воспаление, включая производство свободных радикалов. Экспрессия данного гена повышается при воздействии на клетки свободных радикалов.

Наиболее близким аналогом изобретения является способ определения этиологии 30 хронического гепатита, заключающийся в определении активности у-глутамилтранспептидазы в печеночной и в периферической венозной крови. При значении этой активности, равной 1,49-5,56, диагностируют хронический гепатит алкогольной этиологии [авторское свидетельство SU 1397834, 1988]. Недостатком прототипа является трудность взятия печеночной пробы.

35 Задачей изобретения является разработка способа определения этиологии острого токсического гепатита.

Техническим результатом изобретения является повышение точности диагностики за счет получения этиологических критериев острого токсического гепатита на ранних стадиях развития заболевания..

40 Предлагаемый способ определения этиологии острого токсического гепатита осуществляется следующим образом. Проводят выделение РНК и количественный анализ РНК гена NFE2L2, затем определяют токсикант, вызвавший повреждение гепатоцитов. Для этого образцы РНК выделяют из лимфоцитов периферической венозной крови. Целостность РНК оценивается электрофорезом в 1%-ном агарозном 45 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 NFE2L2 проводят ПЦР со специфичными праймерами, затем нормализацию количества РНК до эндогенного контроля GAPDH.

После проводят количественный анализ РНК гена NFE2L2 с использованием специфичных TaqMan зондов. После проводят статистический анализ экспрессии гена NFE2L2.

При кратности экспрессии гена NFE2L2 относительно экспрессии GAPDH от -10 до 0 диагностируют острый токсический гепатит, вызванный отравлением этанолом, при кратности экспрессии от 0,1 до 10 диагностируют острый токсический гепатит, вызванный отравлением химическими веществами или лекарствами.

Было проведено исследование по предлагаемому способу 184 больных, из них 94 пациента были с острым токсическим гепатитом, вызванным отравлением этанолом, 90 пациентов с острым токсическим гепатитом, вызванным отравлением химическими веществами или лекарствами. Диагноз острого токсического гепатита устанавливался на основании общепринятых критериев в соответствии с МКБ 10. Кратность экспрессии гена NFE2L2 относительно экспрессии GAPDH в группе с острым токсическим гепатитом, вызванным отравлением этанолом, составляла от -10 до 0. У пациентов с острым токсическим гепатитом, вызванным отравлением химическими веществами или лекарствами, кратность экспрессии составляла от 0,1 до 10. Различия кратности экспрессии гена NFE2L2 относительно экспрессии GAPDH статистически значимо различались в группах острого токсического гепатита в зависимости от токсиканта, вызвавшего повреждение гепатоцитов ($F=5,16$; $p=0,003$).

Сущность изобретения поясняется следующими клиническими примерами.

Пример 1.

Больной Р., 1988 года рождения, поступил в приемное отделение больницы скорой медицинской помощи. Диагноз: отравление неизвестным веществом; Сознание отсутствует. С целью определения дальнейшей тактики лечения необходимо определить характер повреждения печени и чем произошло отравление. 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 NFE2L2 и статистический анализ экспрессии гена NFE2L2 с использованием специфичных TaqMan зондов. Кратность экспрессии гена NFE2L2 составила -10,0. Диагностируют острый токсический гепатит, вызванный употреблением этанола. Результаты токсикологического исследования содержимого желудка и биологических жидкостей пациента: больной употреблял этанол.

Пример 2.

Больной Ф., 1989 года рождения, поступил в стационар без сознания в остром периоде отравления. 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 NFE2L2 и статистический анализ экспрессии гена NFE2L2 с использованием специфичных TaqMan зондов. Кратность экспрессии гена NFE2L2 составила -5,2. Диагностируют острый токсический гепатит, вызванный употреблением этанола. Результаты токсикологического исследования содержимого желудка и биологических жидкостей пациента: больной употреблял этанол.

Пример 3.

Больной К., 1964 года рождения, поступил в стационар после отравления при употреблении 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 NFE2L2 и статистический анализ экспрессии гена NFE2L2 с использованием специфичных TaqMan зондов. Кратность экспрессии гена NFE2L2 составила 0. Диагностируют острый токсический гепатит, вызванный употреблением этанола. Результаты токсикологического исследования содержимого желудка и биологических жидкостей пациента: больной употреблял этанол.

Пример 4.

Больная О., 1987 года рождения, поступила в стационар без сознания, с признаками отравления. 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 NFE2L2 и статистический анализ экспрессии гена NFE2L2 с использованием специфичных TaqMan зондов. Кратность экспрессии гена NFE2L2 составила 0,1. Диагностируют острый токсический гепатит, вызванный химическими веществами или лекарствами. Результаты токсикологического исследования содержимого желудка и биологических жидкостей пациента: обнаружен тетрахлорметан в большой концентрации.

Пример 5.

Больной Д., 1985 года рождения, поступил в приемное отделение больницы скорой медицинской помощи. В анамнезе случайное употребление внутрь неизвестного вещества. С целью определения дальнейшей тактики лечения необходимо определить токсикант. 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 NFE2L2 и статистический анализ экспрессии гена NFE2L2 с использованием специфичных TaqMan зондов. Кратность экспрессии гена NFE2L2 составила 5,2. Диагностируют острый токсический гепатит, вызванный попаданием в организм химических веществ или лекарств. Результаты токсикологического исследования содержимого желудка и биологических жидкостей пациента: обнаружены горюче смазочные материалы (бензин).

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 NFE2L2 и статистический анализ экспрессии гена NFE2L2 с использованием специфичных TaqMan зондов. Кратность экспрессии гена NFE2L2 составила 10,0. Диагностируют острый токсический гепатит, вызванный химическими веществами или лекарствами. Результаты токсикологического исследования содержимого желудка и биологических жидкостей пациента: обнаружено употребление ацетаминофена в большой дозировке.

(57) Формула изобретения

Способ определения этиологии острого токсического гепатита, отличающийся тем, что проводят выделение РНК гена NFE2L2 из лимфоцитов периферической венозной крови, нормализацию количества РНК до эндогенного контроля GAPDH, затем проводят количественный анализ РНК гена NFE2L2 и статистический анализ экспрессии гена NFE2L2, после чего при кратности экспрессии гена NFE2L2 относительно экспрессии GAPDH от -10 до 0 диагностируют острый токсический гепатит, вызванный отравлением

этанолом, при кратности экспрессии от 0,1 до 10 диагностируют острый токсический гепатит, вызванный отравлением химическими веществами или лекарствами.

5

10

15

20

25

30

35

40

45