

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Ю.Л.Горбич

« 02 » 2025 г.

Регистрационный № 015-0525

МЕТОД ПРОГНОЗИРОВАНИЯ АЛКОГОЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ ПЕЧЕНИ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: учреждение образования
«Гомельский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ: Першенкова О.С., к.м.н., доцент Воропаев Е.В., д.м.н.,
профессор Михайлова Е.И., Осипкина О.В., Ковалев А.А.

Гомель, 2025

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) представлен метод прогнозирования неблагоприятного течения алкогольной болезни печени (АБП), основанный на определении в крови концентраций адипокинов (адипонектина, лептина) и олигонуклеотидного полиморфизма Ile148Met гена PNPLA3, позволяющий персонифицировать медицинскую профилактику и лечение АБП.

Метод, изложенный в настоящей инструкции, предназначен для врачей-гастроэнтерологов, врачей-терапевтов, врачей общей практики, врачей клинической лабораторной диагностики и иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с АБП в условиях стационара, в амбулаторных условиях и/или условиях отделения дневного пребывания.

1. Показания к применению

Заболевания печени или патологические состояния, вызванные систематическим употреблением алкогольных напитков: алкогольная жировая дистрофия печени [жирная печень] (K70.0), алкогольный гепатит (K70.1), алкогольный фиброз и склероз печени (K70.2), алкогольный цирроз печени (K70.3), алкогольная печеночная недостаточность (K70.4), алкогольная болезнь печени неуточненная (K70.9).

2. Противопоказания к применению

Противопоказания отсутствуют.

3. Перечень необходимых оборудования, медицинских изделий и лекарственных препаратов:

- микропланшетный фотометр для проведения иммуноферментного анализа (ИФА);
- промыватель иммунологических планшетов;
- термошейкер;

- холодильник, поддерживающий температуру в диапазоне +2...+8 °C;
- морозильник, поддерживающий температуру в диапазоне минус 18...минус 20 °C;
- центрифуга (максимальное ускорение – не менее 4000g);
- центрифуга (максимальное ускорение – не менее 13000g);
- микроцентрифуга-вортекс;
- ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха;
- твердотельный термостат, поддерживающий диапазон температур +40...+100 °C;
- аспиратор с колбой-ловушкой объемом 1л;
- амплификатор (термоциклер);
- система для электрофоретического разделения и детекции нуклеиновых кислот;
- наборы реагентов для проведения иммуноферментного анализа для определения концентрации адипонектина в сыворотке (плазме) крови;
- наборы реагентов для проведения иммуноферментного анализа для определения концентрации лептина в сыворотке (плазме) крови;
- этиловый спирт 80%;
- набор реагентов для экстракции ДНК,
- ПЦР-смесь;
- праймеры для выявления фрагмента гена PNPLA3:
- прямой: 5'- TGGGCCTGAAGTCCGAGGGT'3,
- обратный: 5'- CCGACACCAGTGCCCTGCAG'3;
- эндонуклеаза рестрикции BstF5I (BseGI);
- агарозный гель (1,7%);
- деионизированная вода;
- этиловый спирт 80%;

- комплект пипеточных дозаторов (объемы: 0,5-10 мкл, 10-100 мкл; 100-1000 мкл);
- штатив для пипеточных дозаторов;
- штатив «рабочее место» для микроцентрифужных пробирок объемом 0,2 мл и 1,5 мл.
- штатив для вакуумных пробирок с ЭДТА для взятия крови;
- термоконтейнер для транспортировки с температурным режимом +2...+8 °С.
- вакуумные пробирки с ЭДТА для взятия крови объемом 4-5 мл;
- ПЦР-пробирки объемом 0,2 мл;
- микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл;
- наконечники без фильтра для автоматического дозатора объемом 200 мкл, 1000 мкл;
- наконечники с фильтром для автоматических дозаторов объемом 10, 20, 200, 1000 мкл;
- стаканы мерные 100, 200, 500 мл;
- бумага фильтровальная;
- комплект средств индивидуальной защиты (одноразовые стерильные халаты, латексные перчатки, маски, бахилы, шапочки).

4. Технология осуществления метода

Метод, изложенный в данной инструкции, реализуется в несколько этапов в соответствии с алгоритмом (приложение 1 к настоящей инструкции).

4.1. Получение и транспортировка биологического материала

В качестве биологического материала используют венозную кровь из кубитальной вены. Получение биологического материала осуществляют натошак в одноразовые пробирки с ЭДТА в соответствии с инструкцией о порядке организации преаналитического этапа лабораторных

исследований (Приложение к приказу Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 10.11.2015 № 1123). Транспортировку образцов крови в лабораторию осуществляют в течение 1-2 часов после взятия биоматериала в термоконтейнере с температурным режимом +2...+8 °С.

4.2. Проведение ИФА

Определение концентрации адипонектина и лептина в сыворотке крови проводят методом ИФА с применением необходимого оборудования и наборов реагентов согласно инструкциям производителя. Единицы измерения адипонектина – нг/мл, лептина – пг/мл.

4.3. Проведение ПЦР для определения полиморфизма Ile148Met гена PNPLA3

Определение олигонуклеотидного полиморфизма гена PNPLA3 Ile148Met осуществляют с использованием метода ПЦР в варианте ПДРФ (полиморфизм длины рестрикционных фрагментов).

4.3.1. Экстракция ДНК

Экстракцию ДНК проводят с использованием коммерческих наборов, адаптированных для экстракции ДНК из лейкоцитов, согласно инструкции производителей.

4.3.2. Проведение ПЦР

Для проведения ПЦР используют программу амплификации: 1 этап (1 цикл) начальная денатурация T= 95°C t= 5 минут; 2 этап (34 цикла) денатурация T= 95°C t= 20 с, отжиг T= 60°C t= 20 с, элонгация T= 68°C t= 20 с. В результате проведения ПЦР получают амплифицированные фрагменты гена PNPLA3, содержащие полиморфизм Ile148Met.

4.3.3. Определение полиморфизма Ile148Met гена PNPLA3

Рестрикцию (расщепление) продуктов ПЦР проводят с помощью фермента BstF5I (BseGI) согласно инструкции производителя. Для детекции продуктов ПЦР и рестрикции используют метод электрофореза в

агарозном геле (окрашивание с применением этидиум бромида) с дальнейшим применением геледокументирующей системы. После обработки рестриктазой ПЦР-продукта образцы с генотипом GG будут визуализироваться в виде одного фрагмента размером 333 п.н.; образцы с генотипом CC – в виде двух фрагментов размером 133 и 200 п.н.; образцы с генотипом GC – в виде трех фрагментов размером 133, 200 и 333 п.н.

4.4. Проведение расчета

4.4.1. Проведение расчета показателя вероятности может быть осуществлено в ручном и автоматическом варианте.

4.4.2. При ручном варианте расчета: определяют вероятность события, внося полученные значения концентрации адипокинов (адипонектина и лептина) и генотип полиморфизма Ile148Met гена PNPLA3 (GG – 1, CC+GC – 0) в регрессионное уравнение (формула 1) и получают значение показателя Y:

$$Y = -35,41 + 2,28 * \log_2(\text{адипонектин}) + 0,25 * \log_2(\text{лептин}) + 1,47 * \text{Ile148Met} * \text{PNPLA3} \quad (1)$$

4.4.3. Определяют вероятность наступления события по формуле:

$$P = \frac{e^Y}{1 + e^Y} \quad (2),$$

где P – вероятность события, e – основание натурального логарифма ($\approx 2,718$).

4.4.4. При автоматическом варианте расчета вероятности события устанавливают на персональном компьютере программу «Калькулятор расчета риска неблагоприятного течения алкогольной болезни печени». Главное окно программы отображено в приложении 2. Доступ к программе по адресу: <https://gsmu.by/upload/calcABP/index.html>

4.4.5. Вносят полученные значения концентрации адипокинов (адипонектина и лептина) и генотип полиморфизма Ile148Met гена

PNPLA3 (GG – 1, CC+GC – 0) в компьютерную программу «Калькулятор расчета риска неблагоприятного течения алкогольной болезни печени».

Включают кнопку для запуска компьютерной обработки (Результат) данных, после чего в диалоговом окне выводятся показатели прогностической вероятности и формулируется заключение о риске развития прогнозируемого события.

4.5. Определение вероятности прогрессирования АБП

Вероятность неблагоприятного течения АБП определяют по уровню Р-значимости (таблица 1).

Таблица 1 – Оценка вероятности неблагоприятного течения АБП на основании значения Р

Вероятность прогнозирования развития АБП	Значение Р
высокая	$>0,49$
низкая	$\leq 0,49$

5. Принятие управленческого решения

При низкой вероятности прогрессирования АБП ($P \leq 0,49$) осуществляют действия в соответствии с заболеванием К70 «Алкогольная болезнь печени» Клинического протокола диагностики и лечения пациентов с заболеваниями органов пищеварения (утвержден постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 01.06.2017 № 54). Через 1 год выполняют повторное обследование для определения риска прогрессирования АБП в соответствии с пунктами 4.1–4.5 настоящей инструкции.

При высокой вероятности ($P > 0,49$) прогрессирования АБП действия в соответствии с заболеванием К70 «Алкогольная болезнь печени»

Клинического протокола диагностики и лечения пациентов с заболеваниями органов пищеварения (утвержден постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 01.06.2017 № 54) дополняют активным амбулаторным наблюдением (приложение 3).

6. Перечень возможных осложнений или ошибок.

При точном соблюдении инструкции ошибки маловероятны.

АЛГОРИТМ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ НЕБЛАГОПРИЯТНОГО ТЕЧЕНИЯ АБП

Получение и транспортировка биологического материала

Проведение ИФА

Проведение ПЦР для исследования полиморфизма Ile148Met гена
PNPLA3

- Экстракция ДНК
- Проведение ПЦР
- Генотипирование полиморфизма Ile148Met гена PNPLA3

Проведение расчета

Определение вероятности прогрессирования АБП

Принятие управленческого решения

**ГЛАВНОЕ ОКНО ПРОГРАММЫ «КАЛЬКУЛЯТОР РАЧЕТА
РИСКА НЕБЛАГОПРИЯТНОГО ТЕЧЕНИЯ АЛКОГОЛЬНОЙ
БОЛЕЗНИ ПЕЧЕНИ»**

**Калькулятор расчета
риска неблагоприятного
течения алкогольной
болезни печени**

Адинопектин (нг/мл):

Лептин (пг/мл):

Ile148Met гена PNPLA3 (генотип):

РЕЗУЛЬТАТ (Вероятность %):

Рассчитать

ОБОСНОВАНИЕ ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТИ ПРАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА ПРОГНОЗИРОВАНИЯ АЛКОГОЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ ПЕЧЕНИ

Алкогольная болезнь печени (АБП) оказывает значительное влияние на глобальное бремя болезней и преждевременную смертность, что делает ее одной из наиболее важных проблем общественного здравоохранения. В 2019 году АБП стала причиной потери 11 миллионов лет жизни во всем мире. Растущее число смертей и лет жизни с поправкой на инвалидность, приписываемых АБП, вызывает неподдельную тревогу со стороны государственных органов и организаций здравоохранения многих стран мира. В период 2000-2019 гг. доля смертей и потерь DALY, связанных с АБП, фактически увеличилась на 22% и 33%, соответственно [1]. Более того, прогнозы предполагают, что экономическое влияние АБП может потенциально удвоиться к 2040 году [2]. АБП все больше распространяется среди молодых людей в возрасте от 20 до 45 лет и стала основной причиной трансплантации печени как в Соединенных Штатах, так и в Европе [3-9]. Во время пандемии COVID-19 существующая тенденция еще больше усилилась, поскольку модели употребления алкоголя с высоким риском совпали с ростом не только госпитализаций по поводу гепатита, но и увеличением смертности, связанной с АБП [10]. Распространенность АБП оценивается в 3,5% среди населения в целом, 26,0% среди лиц, злоупотребляющих алкоголем, и 55,1% среди лиц с расстройствами, связанными с употреблением алкоголя [11]. Тревожно, что 5-летние показатели смертности у пациентов с АБП превышают 50%, а на более поздних стадиях заболевания они еще выше [1].

Не менее остро проблема АБП стоит в Республике Беларусь, которая относится к странам со стабильно высоким потреблением алкоголя, составляющим более 10 литров на человека в год, что значительно

превышает критический уровень, установленный Всемирной организацией здравоохранения (8 л). В стране отмечается волнообразное колебание показателя заболеваемости АБП. Тем не менее, за период с 2010 года по 2019 год заболеваемость АБП увеличилась на 30,6% (с 3,6 на 100 000 населения в 2010 году до 4,7 в 2019 году), фиброзом и циррозом печени – на 26,7% (с 14,6 на 100 000 населения в 2010 году до 18,5 в 2019 году) [12].

АБП проявляется как континуум от простого стеатоза до стеатогепатита, фиброза, цирроза, острого алкогольного гепатита и гепатоцеллюлярной карциномы [13]. Алкогольный стеатоз, развивающийся более чем у 90% людей, потребляющих более 60 граммов этанола в день в течение как минимум 2 недель, считается обратимым при 4–6 неделях воздержания [13]. Постоянное потребление может привести к стеатогепатиту и фиброзу в 10–35% случаев и потенциально далее к появлению цирроза печени. Из-за стертой клинической картины продвинутая АБП долгое время остаётся недиагностированной, что приводит к росту заболеваемости циррозом печени. И действительно, исследование «Глобального бремени болезней, травм и факторов риска» (ГББ) задокументировало увеличение глобальной стандартизированной по возрасту распространенности декомпенсированного цирроза печени с 25,3 на 100 000 человек в 1990 году до 30,0 на 100 000 в 2017 году [14].

Растущее глобальное бремя АБП требует сложного взаимодействия между государственной политикой, регулирующей потребление алкоголя, осведомленностью населения о масштабах заболевания, своевременным обращением к специалистам, использованием современной терапии и достаточным финансированием исследований АБП. Ранняя диагностика и прогноз развития заболевания имеют решающее значение для достижения терапевтической цели у пациентов с АБП, где полное воздержание от

алкоголя, профилактика рецидива его употребления и адекватная терапия заболевания, как ожидается, улучшат общую выживаемость.

В этой связи важной представляется проблема прогнозирования формирования и развития АБП. В литературном контенте способы прогнозирования формирования и течения АБП не представлены. Возможность прогнозирования течения заболевания по результатам биопсии печени существенно ограничена недостатками метода, в числе которых инвазивность, высокая стоимость, ограниченная доступность и возможность получения нерепрезентативных результатов [16]. Прогностическая значимость маркеров фиброза, например, индексов FIB-4, APRI и др., не учитывает выраженность воспалительного процесса и не может являться методом прогноза [17, 18]. Данный факт делает актуальным проведение исследований по моделированию возникновения и прогрессирования АБП, основанного на современных неинвазивных методиках, с целью выделения групп повышенного риска для последующего тщательного мониторинга и проведения своевременной и адекватной терапии.

Литература:

1. Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME). GBD Compare. Seattle, WA: IHME, University of Washington. - 2015. doi://vizhub.healthdata.org/gbd-compare
2. The rising costs of alcohol-associated liver disease in the United States /J.Julien [et al.] // Am J Gastroenterol. – 2024. – 119. – P. 270–277.
3. Terrault NA, Francoz C, Berenguer M, Charlton M, Heimbach J. Liver transplantation 2023: Status report, current and future challenges / N.A.Terrault [et al.] // Clin Gastroenterol Hepatol. – 2023. – 21. – P. 2150–2166.
4. Outcomes of liver transplantation for non-alcoholic steatohepatitis: A European Liver Transplant Registry study /D. Halder [et al.] // J Hepatol. – 2019. –

7. – P.313–322.

5. Tapper EB, Parikh ND. Mortality due to cirrhosis and liver cancer in the United States, 1999-2016: Observational study. *BMJ*. – 2018. – 362. – P. 2817.

6. Dang K, Hirode G, Singal AK, Sundaram V, Wong RJ. Alcoholic liver disease epidemiology in the United States: A retrospective analysis of 3 US databases / K. Dang [et al.] // *Am J Gastroenterol*. – 2020. – 115. – P. 96–104.

7. Projected prevalence and mortality associated with alcohol-related liver disease in the USA, 2019-40: A modelling study / J. Julien [et al.] // *Lancet Public Health*. – 2020. – 5. – P. 316–323.

8. Alcohol-associated liver disease mortality rates by race before and during the COVID-19 pandemic in the US / N.S. Kulkarni [et al.] // *JAMA Health Forum*. – 2023. – 4. – P. 230.

9. World Health Organization. 2021. Global Health Observatory data repository. – 2024. <http://www.who.int/gho/en/>

10. Alcohol-associated liver disease—Global epidemiology / F. Aberg [et al.] // *Hepatology*. – 2024. - 80(6). – P. 1307-1322. DOI: 10.1097/HEP.0000000000000899

11. Prevalence of alcohol-associated liver disease: A systematic review and meta-analysis / S. Amonker [et al.] // *Hepatol. Commun*. – 2023. – 7. – P. 133.

12. Научное обоснование оптимальной с точки зрения общественного здоровья модели потребления алкоголя в Республике Беларусь [Электронный ресурс] /Режим доступа: <https://rnpccmt.by/>. — Дата доступа 12.03.2025].

13. Diagnosis and Treatment of alcohol-associated liver diseases: 2019 Practice Guidance From the American Association for the Study of Liver Diseases / D.W. Grabb [et al.] // *Hepatology*. – 2020. – 71. – P.306–333.

14. GBD 2017 Cirrhosis Collaborators. The global, regional, and national burden of cirrhosis by cause in 195 countries and territories, 1990-2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. – 2020. – 5. – P.245–266.

15. Диагностические возможности методов неинвазивной оценки фиброза при диффузных заболеваниях печени / И.Ю. Пирогова [и др.]//

РЖГК. - 2009, № 4. –С.48-54.

16. Биомаркеры сыворотки крови, ассоциированные с фиброзом печени, у больных сахарным диабетом 2 типа / Я.А. Краснер [и др.] // Сахарный диабет. — 2024. — Т. 27. — №1. — С. 25-32. doi: <https://doi.org/10.14341/DM13059>

17. Алкоголь в Европейском регионе — потребление, вред и политика // Наркология. – 2006. - № 3. - С.24-30.

18. Актуальные проблемы прогнозирования алкогольной болезни печени / С.П. Сернов [и др.] // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2010. – Т. 6. - № 1. – С. 94–100.