

**ОПИСАНИЕ
ИЗОБРЕТЕНИЯ
К ПАТЕНТУ**

(12)

РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ



НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ
СОБСТВЕННОСТИ

(19) **ВУ** (11) **17965**

(13) **С1**

(46) **2014.02.28**

(51) МПК

G 01N 33/53 (2006.01)

(54)

**СПОСОБ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РЕЗУЛЬТАТА
ПРОТИВОВИРУСНОГО ЛЕЧЕНИЯ ХРОНИЧЕСКОГО
ГЕПАТИТА С, ВЫЗВАННОГО HCV ГЕНОТИП 3А,
ПРЕПАРАТОМ ИНТЕРФЕРОНА- α**

(21) Номер заявки: а 20110529

(22) 2011.04.25

(43) 2012.12.30

(71) Заявители: Государственное учреждение "Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека"; Учреждение образования "Гомельский государственный медицинский университет" (ВУ)

(72) Авторы: Красавцев Евгений Львович; Мицура Виктор Михайлович; Воробеева Алла Викторовна (ВУ)

(73) Патентообладатели: Государственное учреждение "Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека"; Учреждение образования "Гомельский государственный медицинский университет" (ВУ)

(56) RU 2339949 C1, 2008.

RU 2287825 C1, 2006.

RU 2222016 C1, 2004.

RU 2379689 C1, 2010.

(57)

Способ прогнозирования результата противовирусного лечения хронического гепатита С, вызванного HCV генотип 3а, препаратом интерферона- α , заключающийся в том, что до начала лечения в сыворотке крови больного определяют уровень интерлейкина-1 α и прогнозируют отсутствие положительного результата противовирусного лечения препаратом интерферона- α при уровне интерлейкина-1 α от 0 до 57,8 пг/мл или наличие положительного результата при уровне интерлейкина-1 α более 57,8 пг/мл.

Изобретение относится к области медицины, а именно к инфекционным болезням и иммунологии, и может найти применение в стационарных и амбулаторных учреждениях, где производится диагностика и назначение лечения пациентам с хроническим гепатитом С.

В настоящее время основным способом противовирусного лечения хронического гепатита С (ХГС) с доказанной эффективностью является применение интерферона- α (α -ИФН) [1]. К сожалению, стабильные положительные результаты такой терапии удается достичь лишь у 30-40 % пациентов.

Известно, что 1b генотип вируса гепатита С (HCV) является неблагоприятным прогностическим фактором, определяющим результат противовирусной терапии. Неэффективность интерферонотерапии также может быть связана с иммунными нарушениями [1, 2]. Т-лимфоциты-хелперы (Тх) играют существенную роль в регуляции иммунного ответа при ХГС, в результате распознавания антигена они дифференцируются в Тх1 и Тх2 фенотипы, вырабатывающие две различные группы цитокинов. Цитокины ИЛ-1 α и ИЛ-1 β продуцируются мононуклеарами периферической крови.

ВУ 17965 С1 2014.02.28

Традиционно для прогнозирования ответа на лечение препаратами интерферона производится определение рибонуклеиновой кислоты (РНК) HCV методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в крови пациента через 12 недель от начала лечения - ранний ответ на лечение [3,4]. При наличии раннего ответа с отрицательным результатом ПЦР на РНК HCV, прогнозируют стойкий ответ на терапию, при отсутствии раннего ответа с положительным результатом ПЦР на РНК HCV - отсутствие стойкого ответа на лечение [3].

В работе японских авторов Masaki N. и соавт., 2002 показано, что соотношение Tх1/Tх2 было выше у не ответивших на лечение интерфероном, снижение этого соотношения прогнозировало длительный вирусологический ответ. Использовался α - или β -интерферон в виде монотерапии, определялись внутриклеточные цитокины ИФН- γ и ИЛ-4, точные значения уровней цитокинов и генотип вируса не учитывались [2].

В исследовании Neuman M.G. и соавт., 1999 показатели цитокинов в сыворотке крови такие, как ФНО- α , ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-12, TGF- β 1 использовались для прогнозирования стойкого ответа на интерферонотерапию. Выявлено, что низкие уровни ФНО- α и высокие уровни ИЛ-8 были факторами, ассоциированными со стойким ответом на терапию. В данной работе использован ограниченный набор цитокинов, не указаны генотип вируса и конкретные граничные значения цитокинов для целей прогнозирования эффективности лечения [1].

Известен способ прогнозирования результатов лечения больных хроническим HCV препаратами интерферона- α , включающий применение препарата интерферона- α отличающийся тем, что определяют синтез *in vitro* ИФН- γ и ИЛ-4 мононуклеарами периферической крови до и через 4,5 ч после введения первой дозы препарата интерферона- α , и при выявлении более чем двукратного увеличения синтеза ИФН- γ и соотношения синтеза ИФН- γ /ИЛ-4 прогнозируют развитие вирусологического ответа в ходе 24-недельной интерферонотерапии, а при выявлении менее чем двукратного роста показателей синтеза ИФН- γ и соотношения синтеза ИФН- γ /ИЛ-4 прогнозируют отсутствие вирусологического ответа [5].

Исследования по определению синтеза ИФН- γ и ИЛ-4 мононуклеарами периферической крови *in vitro* проводятся только в специализированных лабораториях и в большинстве лечебных учреждений не применимы. В данных исследованиях не учитывался генотип вируса, влияющий на эффективность терапии, при этом точные уровни цитокинов не были учтены.

В результате проведенного информационного поиска выявлен наиболее близкий к заявляемому способ прогнозирования стабильной ремиссии при проведении противовирусной терапии у больных острым гепатитом С. Согласно известному способу прогнозирования стабильной ремиссии при проведении противовирусной терапии у больных острым гепатитом С, включающем иммунологические исследования сыворотки крови, у больного определяют содержание в сыворотке крови интерферона- γ (ИНФ- γ) до начала лечения и через 2 недели после начала лечения и стабильную ремиссию прогнозируют, если через 2 недели после начала лечения содержание ИНФ- γ в 1,5-2 раза и более превышает содержание ИНФ- γ до начала лечения [6] - прототип.

Недостатки способа заключаются в необходимости двукратного исследования уровней цитокина, возможности использования только при остром гепатите С, который редко диагностируется и не всегда требует немедленного назначения лечения, без учета генотипа вируса, являющегося определяющим фактором ответа на лечение.

Задачей заявляемого изобретения является разработка доступного для практических учреждений здравоохранения способа прогнозирования, повышения точности прогнозирования результатов лечения, в частности, возможности развития раннего вирусологического ответа у больных с ХГС с не 1b генотипом HCV препаратами интерферона- α .

Способ прогнозирования результата противовирусного лечения хронического гепатита С, вызванного HCV генотип 3a, препаратом интерферона- α , заключающийся в том, что до начала лечения в сыворотке крови больного определяют уровень интелейкина-1 α и прогнозируют отсутствие положительного результата противовирусного лечения препа-

ВУ 17965 С1 2014.02.28

ратом интерферона- α при уровне интелейкина-1 α от 0 до 57,8 пг/мл или наличие положительного результата при уровне интелейкина-1 α более 57,8 пг/мл.

Для решения данной задачи ретроспективно проанализированы уровни цитокина ИЛ-1 α у пациентов, получавших курс терапии препаратами интерферона- α . У 38 больных ХГС впоследствии назначалось исследование РНК HCV для определения раннего вирусологического ответа, и у 34 пациентов - для определения устойчивого или длительного вирусологического ответа. Для определения уровней ИЛ-1 α в сыворотках крови исследуемых лиц применялись иммуноферментные наборы реагентов для определения цитокинов "ProCon IL-1 α " (ООО "Протеиновый контур", С.-Петербург).

Диагноз у всех больных был верифицирован путем обнаружения РНК вируса гепатита С методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Использовались тест-системы фирмы "АмплиСенс" (Россия). Генотип вируса определялся методом ПЦР (тест-система "АмплиСенс HCV-МОНИТОР-FRT").

Ранний вирусологический ответ на терапию - отсутствие РНК HCV в крови через 3 месяца от начала лечения - был у 25 пациентов, стойкий вирусологический ответ - отсутствие РНК HCV в крови через 6 месяцев после завершения лечения - имелся у 11 пациентов.

Учитывая, что полученные результаты имели ненормальное распределение, использовались методы непараметрической статистики [7] для сравнения полученных результатов. У больных ХГС как с ранним, так и с устойчивым или длительным вирусологическим ответом регистрировались более высокие уровни ИЛ-1 α : медиана (Me) 86,5 пг/мл - в случае раннего ответа на лечение и Me 86,49 пг/мл - в случае длительного ответа на лечение соответственно, чем у пациентов, у которых этот ответ не наблюдался: в случае раннего ответа на лечение - Me 27,81 пг/мл и в случае длительного ответа на лечение - Me 32,71 пг/мл соответственно, различия при статистической обработке материала оказались не значимы: $p > 0,05$.

Так как неблагоприятным прогностическим фактором, влияющим на результат противовирусной терапии, является 1b генотип HCV [3], проведено сравнение уровня цитокинов до начала интерферонотерапии в зависимости от вирусологического ответа у больных ХГС с 1b генотипом и другими генотипами HCV.

У 11 пациентов ХГС с 1b генотипом с ранним вирусологическим ответом несколько выше был определен уровень ИЛ-1 α : Me 70,88 пг/мл, чем у 8 больных без вирусологического ответа в эти сроки: Me 36,39 пг/мл, $p > 0,05$. При сравнении уровней цитокина ИЛ-1 α методами непараметрической статистики с применением теста Манна-Уитни были выявлены более высокие его уровни: Me 95,94 пг/мл: в группе 7 больных ХГС с не 1b генотипом HCV, ответивших на терапию через 6 месяцев и более после окончания лечения, чем у 9 больных, не ответивших на терапию: Me 21,11 пг/мл, $p = 0,039$.

Для анализа прогностической значимости уровней ИЛ-1 α , для которых получены значимые различия при неодинаковом вирусологическом ответе в различные сроки лечения с помощью теста Манна-Уитни, использовался ROC-анализ [8]. Результаты ROC-анализа представлены на фиг. 1 - ROC-кривая для ИЛ-1 α при раннем вирусологическом ответе, на фиг. 2 - ROC-кривая для ИЛ-1 α при отдаленном вирусологическом ответе.

В таблице представлены прогностические значения исследованных цитокинов ИЛ-1 α для оценки эффективности интерферонотерапии при ХГС с не 1b генотипом HCV. Сравнили площади под характеристической кривой (ППК), определили 95 % доверительный интервал (ДИ) оценки площадей, нашли точку разделения, оценили чувствительность (Чв) и специфичность (Сп) данного параметра при использовании найденной точки разделения.

Прогностические значения исследованных цитокинов ИЛ-1 α

Цитокин	Ответ	ППК	95 % ДИ	p	Точка разделения, пг/мл	Чв, %	Сп, %
ИЛ-1 α	ранний	0,743	0,494-0,911	0,0447	не более 57,76	100,0	57,1
	отдаленный	0,810	0,540-0,956	0,0079			71,4

По итогам ROC-анализа показано прогностическое значение уровня ИЛ-1 α для раннего и отдаленного вирусологического ответа. Так, при точке разделения не более 57,76 пг/мл, прогнозируют отсутствие эффективности лечения через 3 месяца от начала терапии: чувствительность - 100 %, специфичность - 57,1 %, $p = 0,045$, и при оценке устойчивого или длительного ответа: чувствительность - 100 %, специфичность - 71,4 %, $p = 0,008$.

Пример 1.

Пациентка М.С.Н., 22 года, студентка, история болезни № 6054. Находилась на лечении в отделении хронических вирусных гепатитов УЗ "ГОИКБ". Диагноз: хронический гепатит С (анти-НСVtot положительный, РНК НCV положительный, генотип НCV 3a) с умеренной активностью и умеренным фиброзом. Заражена предположительно 15 лет назад. Биохимический анализ крови: билирубин общ. 8,18 мкмоль/л, тимоловая проба 5,0 ед. SH, АЛТ 0,52 мккат/л (N 0,06-0,14), γ -ГТП 24,0 Е/л (N до 50). Маркеры вирусных гепатитов и ВИЧ: ИФА ВИЧ - отр.; ИФА анти-НСVtot - пол., HBsAg - отр. ПНР: РНК НCV пол., генотип 3a, титр РНК 10-4. УЗИ органов брюшной полости: печень увеличена за счет правой доли, эхогенность умеренно повышена, структура неоднородная, диффузные изменения выраженные, сосудистый рисунок обеднен. V.portae 11 мм. Селезенка незначительно увеличена до 113×51 мм, эхогенность повышена, селезеночная вена 6 мм (N до 7). Желчный пузырь, поджелудочная железа - без эхопатологии. Заключение: признаки хронического гепатита. Биопсия печени: картина хронического гепатита с умеренной активностью: ГИСА 25 баллов и умеренным фиброзом: ГИСХ 6 баллов. У пациентки определен уровень цитокина ИЛ-1 α в сыворотке крови, значение уровня цитокина ИЛ-1 α составило 107,45 пг/мл, что предсказало положительный результат на предполагаемое лечение препаратом интерферона- α . Назначено лечение интерфероном- α (препарат "Эберон альфа") по 3 млн МЕ 3 раза в неделю и рибавирин 1000 мг/сут в течение 6 месяцев. Через 3 месяца лечения отмечен ранний вирусологический ответ: РНК НCV отрицательна в ПЦР, уровни АЛТ нормализовались. Имелся и стойкий вирусологический ответ через 6 месяцев на лечение интерфероном- α и рибавирином.

Пример 2.

Пациент С.И.Е., 42 года, рабочий, история болезни № 1653. Находился на лечении в отделении хронических вирусных гепатитов УЗ "ГОИКБ", затем на диспансерном наблюдении. Диагноз: хронический гепатит С (анти-НСVtot пол., РНК НCV пол., генотип НCV 3 α) с умеренной активностью и слабым фиброзом. Заболевание выявлено в 1999 году, путь и время заражения неизвестны. Биохимический анализ крови: билирубин общ. 15,03 мкмоль/л, тимоловая проба 7,0 ед. SH, АЛТ 0,94 мккат/л (N 0,06-0,14), γ -ГТП 85,7 Е/л (N до 50). Маркеры вирусных гепатитов и ВИЧ: ИФА ВИЧ - отр.; ИФА анти-НСVtot - пол., HBsAg - отр. ПЦР: РНК НCV пол., генотип 3a, вирусная нагрузка 3026525 МЕ/мл. УЗИ органов брюшной полости: печень увеличена за счет правой и левой доли, эхогенность повышена, структура неоднородная, сосудистый рисунок обеднен, деформирован. V.portae 12 мм. Селезенка не увеличена - 105×45 мм, селезеночная вена 6 мм (N до 7). Желчный пузырь, поджелудочная железа - без эхопатологии. Заключение: признаки хронического гепатита. Биопсия печени: картина хронического гепатита с умеренной активностью: ИГА 19 баллов и слабым фиброзом: ГИС 2 балла. У пациента определили уровень цитокина ИЛ-1 α в сыворотке крови, значение уровня цитокина составило ИЛ-1 α 2,14 пг/мл, что предполагало отсутствие ответа на планируемое лечение. Однако основанием для назначения пациенту антивирусной терапии послужили умеренная активность, слабый фиброз и обнаружение РНК НCV. Было начато лечение: интерферон- α ("Эберон альфа"), по 3 млн МЕ 6 раз в неделю в течение 1 месяца, затем по 3 млн 3 раза в неделю в течение 2 месяцев. Через 3 месяца лечения ранний вирусологический ответ отсутствовал (РНК НCV положительна в ПЦР), уровни АЛТ не нормализовались. Терапия была отменена, в динамике маркеры НCV-инфекции и повышенные значения АЛТ сохранялись. Таким

образом, ранний и стойкий вирусологический ответ на лечение α -интерфероном отсутствовал, что подтвердило предлагаемый способ прогнозирования результатов лечения.

Предложенный способ может применяться в любых лечебных учреждениях, где имеется ИФА-анализатор, в большинстве лечебных учреждений, где назначается лечение интерфероном- α . Исследование безопасно, инвазивное вмешательство ограничено однократным забором крови из вены, отсутствуют дополнительные затраты на оборудование и обучение персонала, не трудоемко. Способ позволяет точнее прогнозировать эффективность интерферонотерапии на ранних стадиях заболевания, что дает возможность своевременной коррекции тактики противовирусной терапии у лиц с не-1b генотипом HCV.

Источники информации:

1. Neuman M.G. et al. Predictors of Sustained Response to Alpha Interferon Therapy in Chronic Hepatitis C // *Clinical Biochemistry*. - 1999. - Vol. 32. - No. 7. - P. 537-545.

2. Masaki N., Fukushima S., Hayashi S. N. Lower Th-1/Th-2 Ratio Before Interferon Therapy May Favor Long-Term Virological Responses in Patients with Chronic Hepatitis C // *Digestive Diseases and Sciences*. - 2002. - Vol. 47. - No. 10. - P. 2163-2169.

3. Ключарева А.А., Голобородько Н.В., Жмуровская Л.С. и др. Лечение вирусных гепатитов / Под ред. А.А.Ключаревой. - Минск: ООО "ДокторДизайн", 2003. - С. 85.

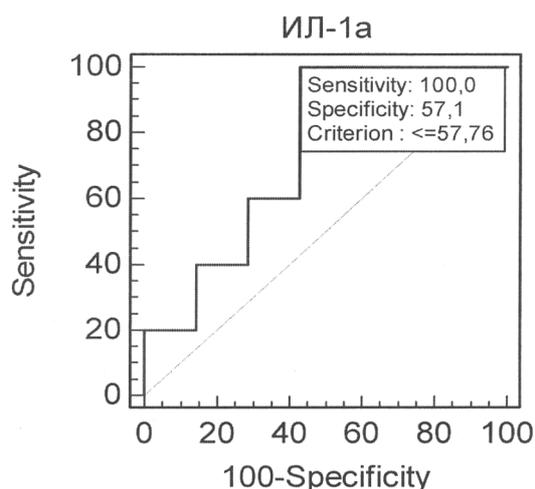
4. Шахгильдян И.В., Михайлов М.И., Онищенко Г.Г. Парентеральные вирусные гепатиты (эпидемиология, диагностика, профилактика). - М.: ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ, 2003. - С. 117-119.

5. Патент РФ 2287825, МПК⁷ G 01N 33/68, 2006.

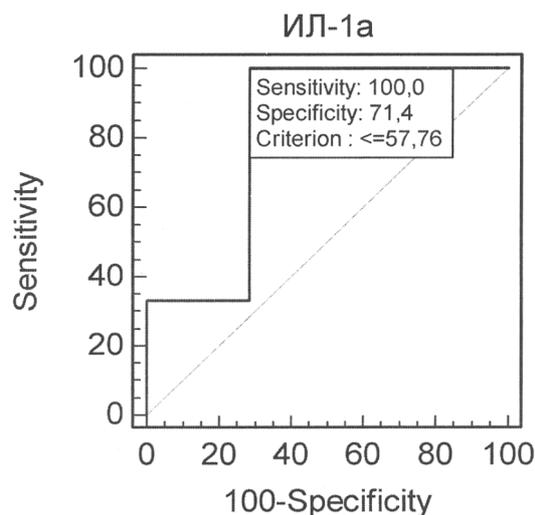
6. Патент РФ 2339949, МПК⁷ G 01N 33/53, 2008.

7. Петри А., Сэбин К., Петри А. Наглядная медицинская статистика: Пер. с англ. В.П.Леонова. 2-е изд., перераб. и доп. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. - С.56.

8. Петри А., Сэбин К. Наглядная медицинская статистика: Пер. с англ. В.П.Леонова. 2-е изд., перераб. и доп. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. - С.109.



Фиг. 1



Фиг.2