

**ОПИСАНИЕ
ИЗОБРЕТЕНИЯ
К ПАТЕНТУ**

(12)

РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ



НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ
СОБСТВЕННОСТИ

(19) **ВУ** (11) **18177**

(13) **С1**

(46) **2014.04.30**

(51) МПК

G 01N 33/53 (2006.01)

(54)

**СПОСОБ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РЕЗУЛЬТАТА
ИНТЕРФЕРОНОТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКОГО ГЕПАТИТА С,
ВЫЗВАННОГО HCV С ГЕНОТИПОМ 3a ИЛИ 2a**

(21) Номер заявки: а 20110808

(22) 2011.06.10

(43) 2013.02.28

(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; Воропаева 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.

(57)

Способ прогнозирования результата интерферонотерапии хронического гепатита С, вызванного HCV с генотипом 3a или 2a, заключающийся в том, что до начала интерферонотерапии в сыворотке крови пациента определяют уровень ИЛ-4 и прогнозируют положительный результат интерферонотерапии при уровне ИЛ-4 более 15,58 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. Применение пегилированных интерферонов, весьма дорогостоящих и недоступных большинству больных ХГС в Республике Беларусь, позволяет повысить эффективность лечения лишь в 2 раза по сравнению с простыми препаратами интерферона [2].

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, 3]. 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 18177 С1 2014.04.30

Традиционно для прогнозирования ответа на лечение препаратами интерферона определяют наличие рибонуклеиновой кислоты (РНК) HCV методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в крови пациента через 12 недель от начала лечения - ранний ответ на лечение [2, 4]. При наличии раннего ответа с отрицательным результатом ПЦР на РНК HCV прогнозируют стойкий ответ на терапию и лечение продолжается, при отсутствии раннего ответа с положительным результатом ПЦР на РНК HCV - отсутствие стойкого ответа на лечение [2] и лечение отменяют.

В работе японских авторов (N. Masaki и соавт., 2002) показано, что соотношение $Tx1/Tx2$ 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 [3].

В исследовании M.G. Neuman 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].

Однако 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, включающей 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 уровня 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, повышение точности прогнозирования результатов лечения, в частности возможности развития раннего и первичного вирусологического ответа, у больных с ХГС препаратами интерферона- α .

Способ прогнозирования результата интерферонотерапии хронического гепатита С, вызванного HCV с генотип 3a или 2a, заключается в том, что до начала интерферонотерапии в сыворотке крови пациента определяют уровень цитокина ИЛ-4 прогнозируют положительный результат интерферонотерапии при уровне ИЛ-4 более 15,58 пг/мл.

Для решения данной задачи ретроспективно проанализированы уровни цитокина ИЛ-4 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-4 в сыворотках крови исследуемых лиц применялись иммуноферментные наборы реагентов для определения цитокинов "ProCon IL-4" (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-МОННТОР-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-4: медиана (Me) 16,48 пг/мл - в случае раннего ответа на лечение и Me 15,78 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 4,65 пг/мл и в случае длительного ответа на лечение - Me 10,78 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 [2], 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 уровень ИЛ-4 (Me 9,78 пг/мл) практически не отличался от содержания ИЛ-4 у 8 больных без вирусологического ответа в эти сроки: Me 12,72 пг/мл, $p > 0,05$. При сравнении уровней цитокина ИЛ-4 методами непараметрической статистики с применением теста Манна-Уитни были выявлены более высокие его уровни Me 26,26 пг/мл в группе 14 больных ХГС с не 1b генотипом HCV, ответивших на терапию через 3 месяца после начала лечения, чем у 5 больных, не ответивших на терапию в эти сроки лечения: Me 0,25 пг/мл, $p < 0,05$).

Для анализа прогностической значимости уровней ИЛ-4, 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-4 при раннем вирусологическом ответе, на фиг. 2 - ROC-кривая для ИЛ-4 при первичном вирусологическом ответе.

В таблице представлены прогностические значения исследованных цитокинов ИЛ-4 для оценки эффективности интерферонотерапии при ХГС с 2,3 генотипом HCV.

Сравнили площади под характеристической кривой (ПГЖ), определили 95 % доверительный интервал (ДИ) оценки площадей, нашли точку разделения, оценили чувствительность (Чв) и специфичность (Сп) данного параметра при использовании найденной точки разделения. По итогам ROC-анализа показано прогностическое значение уровня ИЛ-4 для раннего и первичного вирусологического ответа. Так, при точке разделения не

ВУ 18177 С1 2014.04.30

более 0,56 пг/мл прогнозируют отсутствие эффективности лечения через 3 месяца от начала терапии: чувствительность - 80 %, специфичность - 93,7,1 %, $p = 0,0049$, и при оценке первичного ответа: при точке разделения не более 15,58 пг/мл, прогнозируют отсутствие эффективности лечения: чувствительность - 80 %, специфичность - 84,6 %, $p = 0,00116$.

Прогностическое значение исследованных цитокинов для оценки эффективности интерферонотерапии при ХГС с 2, 3 генотипами HCV

Цитокин	Ответ	ППК	95 % ДИ	p	точка разделения, пг/мл	Чв, %	Сп, %
ИЛ-4	ранний	0,794	0,563-0,936	0,0049	$\leq 0,56$	80,0	93,7
	первичный	0,785	0,531-0,938	0,0116	$\leq 15,58$	80,0	84,6

Пример 1.

Пациентка М.С.Н., 18 лет, студентка, история болезни № 733. Находилась на лечении в отделении хронических вирусных гепатитов УЗ "ГОИКБ". Диагноз: хронический гепатит С (анти-HCVtot положительный, РНК HCV положительный, генотип HCV 3a) с высокой биохимической активностью. Заражена предположительно 2 года назад, путь заражения половой (у партнера ХГС). Биохимический анализ крови: билирубин общ. 8,18 мкмоль/л, тимоловая проба 6,5 ед. SH, АЛТ 1,7 мккат/л (N 0,06-0,14). Маркеры вирусных гепатитов и ВИЧ: ИФА ВИЧ - отр.; ИФА анти-HCVtot - пол., HBsAg - отр. ПНР: РНК HCV пол., генотип 3a, титр РНК 10^{-5} . УЗИ органов брюшной полости: печень увеличена за счет правой доли, эхогенность умеренно повышена, структура неоднородная, диффузные изменения, сосудистый рисунок деформирован, усилен. V. portae 10 мм. Селезенка незначительно увеличена до 100 × 50 мм, эхогенность повышена, селезеночная вена 6 мм (N до 7). Желчный пузырь - без эхопатологии. Поджелудочная железа - структура однородная, эхогенность умеренно повышена. Заключение: признаки хронического гепатита с жировым гепатозом, отдельные признаки липоматоза поджелудочной железы. У пациентки определен уровень цитокина ИЛ-4 в сыворотке крови, значение уровня цитокина ИЛ-4 составило 30,76 пг/мл, что предсказало положительный результат на предполагаемое лечение препаратом интерферона- α . Назначено лечение интерфероном- α (препарат "Эберон альфа") по 3 млн МЕ 6 раза в неделю в течение месяца, затем 3 млн МЕ 3 раза в неделю до 12 месяцев. Через 3 месяца лечения отмечен ранний вирусологический ответ: РНК HCV отрицательна в ПЦР, уровни АЛТ нормализовались. Имелся и первичный, и стойкий вирусологический ответ через 6 месяцев на лечение интерфероном- α .

Пример 2.

Пациентка Я.С.Н., 31 год, санитарка, история болезни № 36. Находилась на лечении в отделении хронических вирусных гепатитов УЗ "ГОИКБ", затем на диспансерном наблюдении. Диагноз: хронический гепатит С (анти-HCVtot пол., РНК HCV пол., генотип HCV 2a) с умеренной активностью и слабым фиброзом. Заболевание выявлено в 1996 году при донорстве, в анамнезе переливание препаратов крови при родах. Биохимический анализ крови: билирубин общ. 9,09 мкмоль/л, тимоловая проба 4,1 ед. SH, АЛТ 0,78 мккат/л (N 0,06-0,14). Маркеры вирусных гепатитов и ВИЧ: ИФА ВИЧ - отр.; ИФА анти-HCVtot - пол., HBsAg - отр. ПЦР: РНК HCV пол., генотип 2a, вирусная нагрузка 997500 МЕ/мл. УЗИ органов брюшной полости: печень не увеличена, эхогенность повышена, структура однородная, сосудистый рисунок обычный, V. portae 11 мм. Селезенка увеличена - 120 × 65 мм, селезеночная вена 5 мм (N до 7). Желчный пузырь - без эхопатологии. Поджелудочная железа - структура однородная, эхогенность умеренно повышена. Заключение: признаки липоматоза поджелудочной железы, хронического гепатита. Биопсия печени: картина хронического гепатита с умеренной активностью: ИГА 18 баллов и слабым фиброзом: ГИС 2 балла. У пациента определили уровень цитокина ИЛ-4 в сыворотке крови, значение уровня цитокина составило ИЛ-40 пг/мл, что предполагало отсутствие ответа на планируемое лечение.

Однако основанием для назначения пациенту противовирусной терапии послужили: умеренная активность, слабый фиброз и обнаружение РНК HCV. 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 HCV положительна в ПЦР), уровни АЛТ не нормализовались. Терапия была отменена, в динамике маркеры HCV-инфекции и повышенные значения АЛТ сохранялись. Таким образом, ранний и стойкий вирусологический ответ на лечение интерферон- α 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 интерферон- 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 2, 3 генотипом HCV.

Источники информации:

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

2. Masaki N., Fukushima S., Hayashi S. 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.

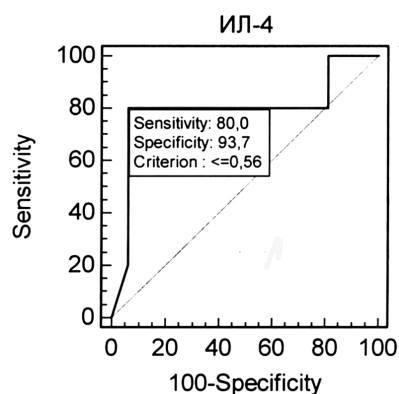
4. Шахгильдян И.В., Михайлов М.И., Онищенко Г.Г. Парентеральные вирусные гепатиты (эпидемиология, диагностика, профилактика). - М.: ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ, 2003. - С. 117-119.

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

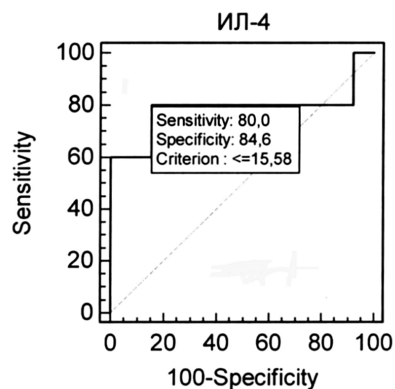
6. Патент РФ 2339949, МПК⁷ G 01N 33/53, 2008.

7. Петри А., Сэбин К. 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