Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>

ДЕРЖАВНА УСТАНОВА

«ІНСТИТУТ ЕПІДЕМІОЛОГІЇ ТА ІНФЕКЦІЙНИХ ХВОРОБ

ім. Л.В. ГРОМАШЕВСЬКОГО

АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ»

**Дьяченко Павло Анатолійович**

УДК 616.36-002.2-022:578.891]-092:612.017

**КЛІНІКО-ПАТОГЕНЕТИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ І ОПТИМІЗАЦІЯ ТЕРАПІЇ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ГЕПАТИТ С**

14.01.13 – інфекційні хвороби

Автореферат

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата медичних наук

Київ – 2009

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Державній Установі «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського АМН України»

|  |
| --- |
| доктор медичних наук, професор **Вовк Алла Дмитрівна**, ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського АМН України», завідувач відділу вірусних гепатитів і СНІДу; |

**Науковий керівник:**

 доктор медичних наук

 **Федорченко Сергій Валерійович,**

 ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб

 ім. Л.В. Громашевського АМН України», завідувач відділу

 вірусних гепатитів і СНІДу.

**Офіційні опоненти:**

доктор медичних наук, професор **Малий Василь Пантелійович**, Харківська медична академія післядипломної освіти МОЗ України, завідувач кафедри інфекційних хвороб.

кандидат медичних наук, доцент **Голубовська Ольга Анатоліївна**, Національний медичний університет імені О.О. Богомольця МОЗ України, доцент кафедри інфекційних хвороб.

Захист відбудеться 16 квітня 2009 р. о 14:00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д.26.614.01 при ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського АМН України» (01015, м. Київ, вул. І. Мазепи, 23).

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського АМН України» (03038, м. Київ, вул. М. Амосова, 5).

 Автореферат розісланий 14 березня 2009 р.



Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради

кандидат медичних наук О.Л.Панасюк

###### ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

######  Актуальність теми. Вірусний гепатит С (ВГС) є основною причиною хронічних хвороб печінки і однією з найбільш актуальних проблем сучасної медицини та інфекційної патології людини як у всьому світі [I.Williams,1999; M.I. Memon, M.A. Memon, 2002], так і в Україні [Ж.І. Возіанова, 2001; А.Л. Гураль, 2004,2005; А.Д.Вовк та ін.,2002]. На тлі стабілізації і навіть зменшення у багатьох країнах захворюваності на вірусний гепатит В (ВГВ) внаслідок активної вакцинопрофілактики груп ризику і ретельного контролю донорської крові на вміст маркерів HBV-інфекції, захворюваність на ВГС стрімко зростає і охоплює все нові популяційні контингенти, захворюваність яких на ВГС раніше була дуже низькою, або зовсім не визначалася. Попри 15 років інтенсивних досліджень в лабораторіях всього світу, наші знання про природу захворювань, що викликаються вірусом гепатиту С (HCV), залишаються все ще обмеженими. Наслідки HCV інфекції різноманітні: від захворювання, що самовиліковується, до тривало персистуючої інфекції, яка приводить у частини хворих до тяжких уражень печінки. Великою мірою гострий гепатит С (ГГС) перебігає в інапарантній, неклінічній формі (за різними оцінками, від 30 до 80% усіх випадків). Проте не залежно від тяжкості захворювання в 50% випадків і більше захворювання переходить в хронічну форму, і як тільки вона встановлюється, спонтанне видужання унеможливлюється. Дійсна реконвалесценція після гострого ГС рідка.

 Зараз чітко встановлено, що HCV інфекція індукує сильні гуморальну і клітинну імунні відповіді [N.N. Zein et al.,1996; T. Berg et al., 1997]. Білки кору, NS3 й NS4, є найбільш імуногенними антигенами як для В-клітин, так і для HLA-II-рестрикованих CD4+ Т-клітин. CD8+ цитотоксичні Т-лімфоцити (ЦТЛ), що інфільтрують печінку, розпізнають епітопи в межах кору Е1, E2/NS1 і NS2 білків завдяки HLA-I антигенам. Відповіді ЦТЛ на коровий та інші білки реєструються в периферичній крові хворих на хронічний гепатит (ХГ). Хоча відповіді HCV-специфічних ефекторних В- і Т-клітин можуть спричинити елімінацію вірусу, у більшості випадків вони не в змозі перешкодити переходу HCV інфекції в хронічну форму. До тепер не знайдені протективні В- і Т-клітинні епітопи. Можливо, їх немає зовсім. Цілком очевидно, що неадекватна імунна відповідь грає фундаментальну роль в незавершеності гострої інфекції, перетворенню її в персистуючу і, очевидно, в патогенезі ураження печінки при ХГ.

 Загально визнано, що в основі ушкодження гепатоцитів лежить автоімунний конфлікт. Проте механізми його реалізації залишаються багато в чому загадковими. В останні роки увагу дослідників привертають питання, пов’язані із програмованою смертю гепатоцитів і імуноцитів при ХГС.

 Безперечно, наслідок захворювання залежить значною мірою від стану імунної системи пацієнта, наявності тих чи інших імунодефіцитів, спрямованості і вираженості імунної відповіді. При гепатовірусній інфекції знайдені численні порушення імунного гомеостазу: фагоцитарної активності, кількості й активності ефекторних Т- і В-лімфоцитів і т.д. Дослідження останніх років показали, що клітинна ланка імунної системи і, в першу чергу, Т-хелпери грають ключову роль в індукції ефективного противірусного імунітету [H.M. Diepolder et al., 1995; T. Poynard et al., 1997]. Проте довга низка запитань все ще чекає свого вирішення.

 Проблема лікування хронічних вірусних гепатитів зараз є чи не найважливішою, оскільки тривалий перебіг інфекції у значної частки пацієнтів приводить до розвитку цирозу та раку печінки. Етіотропна терапія спрямована на пригнічення реплікації вірусу. Кінцевою метою лікування на ранніх стадіях захворювання є елімінація вірусу, ерадикація патологічного процесу. Проте зараз немає надійних лікарських засобів, здатних радикально видалити з організму збудника.

У терапії ХГС тестовані різноманітні противірусні препарати різних фармацевтичних груп: модифіковані нуклеозиди, інгібітори вірусної протеази, імуномодулятори та імунокоректори. Але більшість з них не показали очікуваної ефективності і не мають самостійного значення. До того ж деяким з них притаманна висока токсичність. Протягом багатьох років найбільш широко при терапії ХГС у всьому світі використовуються різні препарати інтерферону (ІФН). Комбінована терапія ІФН плюс рибавірин є зараз головною терапією вибору при лікуванні хронічного ГС.

На жаль, існують досить суворі обмеження при призначенні певної схеми лікування. Навіть при врахуванні усіх предикторів позитивного ефекту лікування частим його наслідком є лише тимчасове пригнічення реплікативної активності вірусу. Ремісія триває кілька місяців після закінчення лікування, після чого дуже часто спостерігається загострення процесу. До того ж у значної кількості хворих ІФН і рибавірин викликають побічні реакції, які примушують припиняти лікування. Нарешті, слід також відзначити, що лікування є тяжкою фінансовою проблемою як для хворих, так і для системи охорони здоров’я в цілому. Саме тому, тривають пошуки нових принципів лікування і нових лікарських засобів. Серед них значну увагу викликають цитокіни – універсальні медіатори імунної відповіді, зокрема інтерлейкін-2, використання якого може бути доцільним в лікуванні хворих на ХГС [A.P. Barreiros et al., 2003; А.Т. Журкин та ін., 2000; Л.Ф. Скляр, Е.В. Маркелова, 2002; В.М. Мицура та ін., 2004].

 **Зв’язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота є фрагментом наукової теми відділу вірусних гепатитів і СНІДу ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського АМН України» «Клініко-епідеміологічна характеристика хронічних гепатитів В і С, удосконалення їх діагностики, лікування та профілактики», № держреєстрації 0199V000703.

 **Мета дослідження.** Оцінка клінічного перебігу та змін цитокінового профілю при ХГС та оптимізації лікування хворих на ХГС рекомбінантним інтерлейкіном-2 (Ронколейкіном).

 **Задачі дослідження:**

 1 Дослідити клініко-біохімічні параметри перебігу ХГС у дорослих хворих.

 2 Визначити субпопуляційний склад лімфоцитів у хворих на ХГС на тлі лікування ронколейкіном.

 3 Визначити спектр імунорегуляторних молекул – цитокінів у різних груп хворих на ХГС.

 4 Визначити клінічну ефективність лікування хворих на ХГС ронколейкіном і оцінити його вплив на показники імунного статусу в групах хворих.

 *Об’єкт дослідження –* хворі на хронічний вірусний гепатит С.

 *Предмет дослідження* – клінічні особливості перебігу ХГС, маркери вірусного гепатиту, лікування хворих на ХГС ронколейкіном та визначення критеріїв його використання, імунний статус хворих на ХГС до, впродовж та після закінчення терапії.

 *Методи дослідження –* клінічні, імунологічні (визначення антигенних маркерів HCV інфекції, кластерів диференціровки (CD) лімфоцитів периферичної крові, сироваткової концентрації цитокінів), біохімічні (визначення амінотрансфераз, альбуміну, імуноглобулінів, білірубіну), молекулярно-біологічні (виявлення й напівкількісне визначення вмісту в крові РНК HCV і реплікативних інтермедіатів), статистичні.

 **Наукова новизна одержаних результатів.**

Показано, що хронічний гепатит супроводжується вираженим імунодефіцитом як гуморальних, так і клітинних ланок імунітету.

Встановлено характерні особливості імунних реакцій, що перебігають при хронічній HCV інфекції за допомогою вивчення цитокінового профілю у співставленні із клініко-лабораторними даними.

Виявлено дисбаланс функціонування системи цитокінів, який має тенденцію до поглиблення при прогресуванні хвороби.

Встановлено, що головною складовою імунопатогенезу ХГС є некомпетентність вірусспецифічних клонів Т-хелперів 2 типу, які відповідають за індукцію гуморальної імунної відповіді. Це пов’язане із апоптозом як Т-, так і В-ефекторів, що розвивається при ХГС.

Доведено, що в умовах слабкої і неефективної антитільної відповіді відбувається гіперіндукція клітинної ланки імунітету, що викликає незбалансовано високий рівень гибелі інфікованих гепатоцитів. Це, в свою чергу, з часом може привести до масивного розвитку сполучної тканини в печінці, тобто до фіброзу і цирозу.

Вперше у вітчизняній практиці у комплексному лікуванні ХГС використаний рекомбінантний препарат ІЛ-2 ­– ронколейкін.

Доведено, що одним із можливих шляхів оптимізації терапії ХГС є поєднання двох етіотропних препаратів із різними механізмами дії – інтерферону альфа-2b (лаферобіон) та ронколейкіну. Проведене дворічне клінічне спостереження з оцінкою ефективності метода лікування за клініко-лабораторними та вірусологічними показниками.

 **Практичне значення отриманих результатів.** Для закладів практичної охорони здоров’я проведені дослідження доповнюють уявлення про зміни, які відбуваються в імунній системі HCV-інфікованих осіб і які є підґрунтям персистенції вірусу і хронізації запального процесу (зміни з боку субпопуляційного складу лімфоцитів та дисбаланс системи цитокінів).

Доведено доцільність визначення показників цитокінового спектру для оцінки характеру перебігу HCV-інфекції, а також клінічної ефективності лікування хворих.

Доведено доцільність використання препарату рекомбінантного ІЛ-2 (ронколейкіну) для лікування хворих на хронічний ГС. Сформульовані рекомендації використання ронколейкіну у комплексній терапії хворих на ХГС.

Матеріали дослідження впроваджені в практичну роботу лікарів-інфекціоністів ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського АМН України».

Отримані результати використані при підготовці інформаційних листів: «Методика застосування «Ронколейкіну» при хронічному гепатиті С / Дьяченко П.А., Вовк А.Д., Федоченко С.В., Ясеновий С.П.№220-2007. К., 2007», «Методика застосування комбінованої терапії «Ронколейкіном» та «Лаферобіоном» при хронічному гепатиті С / Дьяченко П.А., Вовк А.Д., Федоченко С.В., Ясеновий С.П.№221-2007. К., 2007»

 **Особистий внесок дисертанта.**  Автором самостійно здійснено інформаційно-патентний пошук та проведено аналіз наукової літератури, сформульовано мету та задачі роботи, вибрані адекватні матеріали та методи дослідження, здійснено комплексне обстеження хворих і здорових осіб. Дисертант брав участь у проведенні клініко-лабораторних та імунологічних досліджень, самостійно здійснив статистичну обробку отриманих результатів. Аналіз вмісту ФНП-**α**  й ІФН у сироватці крові було проведено за участю автора у відділі експериментальних клітинних ліній (керівник – доктор біологічних наук Ю.Й. Кудрявець) ДУ «Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.С. Кавецького НАН України». Автор особисто написав всі розділи дисертаційної роботи, обґрунтував основні положення, сформулював висновки та практичні рекомендації.

 **Апробація результатів дисертації.** Основні положення дисертації були повідомлені та обговорені на ІІ Республіканській науково-практичній конференції студентів та молодих вчених (м. Суми, 2003 р.); ІІІ Республіканській науково-практичній конференції студентів та молодих вчених (м. Суми, 2004 р.); Науково-практичній конференції “Вірусні хвороби, токсоплазмоз, хламідіоз” (м. Тернопіль, 2004 р.); науково-практичній конференції і пленумі Асоціації інфекціоністів «Хіміотерапія та імунокорекція інфекційних хвороб» (м. Тернопіль, 2005 р.); 10-й Російській конференції «Гепатология сегодня» (м. Москва, 2005 р.); V з’їзді товариства гастроентерологів Росії й ХХХII сесії Центрального науково-дослідного інституту гастроентерології (м. Москва, 2005 р.); VI Всеросійський науково-практичній конференції «Вирусные гепатиты – проблемы эпидемиологии, диагностики, лечения и профилактики» (м. Москва, 2005 р.); VII з’їзді інфекціоністів України «Інфекційні хвороби – загальномедична проблема» (м. Миргород, 2006); Російській науково-практичній конференції, присвяченої 110-річниці кафедри інфекційних хвороб Військово-медичної академії ім. С.М. Кірова “Инфекционные болезни: проблемы здравоохранения и военной медицины” (м. С.-Петербург, 2006 р.); Науково-практичній конференції і пленуму Асоціації інфекціоністів «Хвороби печінки в практиці інфекціоніста» (м. Донецьк, 2007 р.); Міжнародному Євро-азіатськаму конгресі по інфекційним хоробам та 7-му Симпозіумі гепатологів Беларусі (Вітебськ, 2008 р.).

 **Публікації.**  За темою дисертації опубліковано 18 наукових робіт, з яких 6 статей у фахових виданнях, затверджених ВАК України, 2 інформаційних листа й 10 – у збірниках з’їздів та науково-практичних конференцій.

 **Структура та обсяг дисертації.** Дисертацію викладено на 155 сторінках друкованого тексту. Робота складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів та методів дослідження, 4-х розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновків, практичних рекомендацій і списку літературних джерел. Дисертація ілюстрована 4 рисунками, 13 таблицями. Список використаних літературних джерел включає 273 роботи, з них 79 кирилицею і 194 латиницею.

**ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ**

 **Матеріали і методи досліджень.** Під нашим спостереженням знаходилося 126 хворих на ХГС, серед яких було 73 (58 %) чоловіків і 53 (42 %) жінок віком від 18 до 70 років, середній вік 36,2±7,2 років. Діагноз ХГС і ступінь його активності встановлювали згідно сучасної міжнародної класифікації хвороб печінки (Лос Анджелес, 1994). Враховували дані анамнезу та клінічні показники (слабкість, підвищена стомлюваність, зниження працездатності, шкірне свербіння, зниження або відсутність апетиту, епізодична нудота, відчуття тяжкості в правому підребер’ї, гепатомегалія). В таблиці 1 поданий розподіл хворих за віком, статтю, тривалістю захворювання, генотипом вірусу, наявністю супутньої патології, ознаками цирозу та підтвердженням діагнозу ХГС методом пункційної біопсії печінки.

*Таблиця 1*

**Розподіл хворих на ХГС за віком, статтю, тривалістю захворювання, генотипом, наявністю супутньої патології, переходу в цироз та підтвердженням діагнозу ХГС методом пункційної біопсії печінки**

|  |  |
| --- | --- |
| **Критерій** | **Кількість хворих** |
| абсолютне число | % |
| Всього хворих на ХГС | 126 | 100 |
| Стать:– чоловіки– жінки | 7353 | 58,042,0 |
| Вік, роки:18- 3031- 4041- 50Більше 50 | 54262125 | 42,820,716,719,8 |
| Тривалість хвороби:– до 1 року– від 1 року до 3 років– від 3 до 6 років– від 7 до 9 років– від 10 до 20 років– невстановлений термін | 23412712716 | 18,332,521,59,55,512,7 |
| Супутня патологія | 94 | 74,6 |
| Генотип HCV:– 1в– 3а– 2 | 75474 | 59,537,33,2 |
| Пункційна біопсія | 12 | 9,5 |
| Перехід ХГС в цироз печінки | 14 | 11,1 |

У всіх хворих проводили загальний аналіз крові і сечі, досліджували рівні в сироватці крові загального білірубіну та його фракцій, активність амінотрансфераз (АлАТ/АсАТ), концентрацію загального білка та його фракцій, протромбіновий індекс, лужну фосфатазу.

Ступінь активності патологічного процесу встановлювали по наявності астеновегетативних та диспептичних проявів, фактору підвищення АлАТ, рівню білоксинтетичних процесів, даних ультразвукового дослідження. Слабо виражена активність процесу (фактор підвищення рівня АлАТ не перевищував 3) встановлена у 68 хворих (53,9 %). 49 хворих (38,9 %), у яких активність ферменту підвищувалася у 3-5 разів, були віднесені до групи з помірно вираженою активністю процесу.

Верифікація діагнозу та встановлення фази захворювання здійснювали визначенням специфічних серологічних маркерів HCV інфекції (анти-HCV антитіла загальні, анти-HCV-IgM, анти-HCV-IgG, анти-NS3, анти-NS4, анти-NS5) методом імуноферментного аналізу з використанням тест-систем «Діапроф-Мед» (Україна) й «Диагностические системы» (Росія). Фазу реплікативного циклу та ступінь вірусного навантаження (у частки хворих) визначали за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) якісним та напівкількісним методом з використанням тест-систем «Ампли Сенс HCV – 240 s/BKO – 440» (Росія). Генотип HCV також встановлювали за допомогою напівкількісної ПЛР з використанням тест-системи «Вектор-Бест» (Росія).

Концентрацію цитокінів у сироватці крові визначали за допомогою тест-систем «Проконтур» (С.-Пб., Росія) в лабораторії Сумського обласного диспансеру радіаційного захисту населення.

Всі обстежені хворі згідно з характером терапії були розподілені на 3 групи:

1 група хворих, яким проводили мототерапію **ронколейкіном** на фоні базисної терапії, складала 10 осіб (5 чоловіків та 5 жінок) віком від 17 до 35 років (середній вік становив 28,2±7,02 р), тривалість захворювання становила в середньому 4,1±3,53 років (від 1 до 10 років). Найчастіше було діагностовано генотип 1b (8 випадків) та генотип 3 а (2 випадки).

2 група хворих, яким була проведена комбінована терапія з використанням **ронколейкіну та інтерферону альфа-2в** на фоні базисної терапії, складала 10 осіб (9 чоловіків і 1 жінка) віком від 17 до 45 років (середній вік становив 28,1±6,96 р), середня тривалість захворювання 2,66±1,77 років (від 1 до 6 років). При генотипуванні виявлений генотип 1b (7 випадків) та генотип 3 а (3 випадки).

3 група хворих (106), що одержувала лише базисну терапію, яка включала лікувально-охоронний режим, дієтичне харчування (стіл №5 за Певзнером), полівітамінні комплекси, антиоксиданти (берлітіон), гепатопротектори (дарсил, ліволін).

Ефективність проведеної терапії оцінювали на підставі досягнення біохімічної (нормалізація активності АлАТ) та вірусологічної (зменшення на 2 порядки чи зникнення з сироватки хворого HCV РНК) ремісії відповідно до рекомендації Європейської групи по вивченню печінки (Eurohep, 1996).

Групу співставлення складали 25 здорових донорів (середній вік становив 35,7±3,4 років).

 **Виміряння цитотоксичної активності ФНП-α** шляхом його титрування проводили в стабільній клітинній лінії мишиних фібробластів L929 [П.А.Дьяченко та ін., 2005]. Суспензію клітин (3х104 клітин) в об'ємі 0,1 мл вносили до плоскодонних лунок 96-лункової планшети. Через 24 години в перший ряд лунок планшети вносили дослідний розчин і проводили титрування подвійними розведеннями. Останній ряд залишали вільним, як контролі клітин (з актиноміцином Д та без нього). Після титрування в усі лунки планшети додавали по 50 мкл розчину актиноміцину Д (Sigma, США) у кінцевій концентрації 2 мкг/мл. Облік цитотоксичної дії ФНП-**α**  проводили через 24 год. Показник, зворотній останньому розведенню препаратів, яке викликало загибель 50% клітин, враховували як титр ФНП-**α**. Чутливість цієї системи титрування ФНП-**α** становила 2,5 пкг/мл. В якості стандарту використовували високоочищений препарат ФНП-**α** у початкових концентраціях 10 і 2,5 нг/мл.

 Візуалізацію цитотоксичної активності ФНП-**α** в досліджених зразках визначали за допомогою вітального МТТ-тесту (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide), який ґрунтується на зміні забарвлення з густо блакитного на жовтий під дією мітохондріальних ферментів живої клітини. Скорочено, після титрування ФНП-**α** до кожної лунки додавали по 10 мкл розчину МТТ (5 мг/мл), інкубували 4 години при 370С в інкубаторі з 5% СО2. Після цього розчин з лунок видаляли вакуумним насосом і додавали 100 мкл ДМСО. Після 10 хв. інкубації у планшетах визначали за допомогою багатоканального спектрофотометру Малтіскан (Швеція) оптичну густину зразків при 570 нм, а контролів — при 640 нм.

 **Титрування ІФН в клінічних зразках на клітинах MDBK.** Клітини MDBK нарощували на флаконах Т75 до щільного моношару. В лунки 96-лункового планшету вносили по 100 мкл ростового середовища (DMEM із 5% телячої ембріональної сироватки). В перші лунки вносили клінічні зразки в кінцевому розведенні 1/10 за схемою та розтитровували подвійними розведеннями зразки до 10 лунки включно, 11 лунка — контроль клітин, 12 — контроль вірусу. Для підтвердження наявності в даних зразках саме досліджуваного цитокіну — альфа/бета ІФН, паралельно титрували проби, що були в умовах дуже низьких рН (2). По 3-3,5х104 клітин в об’ємі 100 мкл після відокремлення від субстрату за допомогою версену та суміші трипсин-версену вносили в лунки планшету із розтитрованими зразками. Культури витримували 24 год. в CO2  інкубаторі при 37оС.

 Для титрування ІФН в клінічних зразках використовували вірус везикулярного стоматиту (VSV-Vero, пул 910/02) у дозі 5000 БУО/лунку (розведення стоку 10-3). Інкубація протягом 24-48 год. за вищевказаними умовами. Результати класифікували наступним чином: (-) — цитопатична дія вірусу відсутня, клітини формують щільний моно шар; (+) — спостерігається тотальна цитопатична дія, моно шар клітин зруйнований; (±) — 50% клітинного моно шару зруйновано вірусом. Титр ІФН виражали в міжнародних одиницях активності (МО/мл), де 1 МО дорівнює кількості ІФН, що захищає 50% моно шару клітин MDBK від ЦПД VSV. В якості стандарту використовували галузевий стандарт альфа-ІФН, отриманий з Державного НДІ стандартизації та контролю медичних біологічних препаратів ім. Л.О. Тарасевича (Москва, Росія), а також препарати лаферону (рекомбінантний альфа-2b ІФН) та роферону (рекомбінантний альфаА ІФН).

 Одержані результати обробляли методами описувальної статистики (розрахунок середньої величини, середньоквадратичного відхилення, критерій достовірності Стьюдента, значення достовірності) за допомогою програм Microsoft Excel. З метою виявлення кореляційних залежностей між окремими показниками були виведені коефіцієнт кореляції (R) і вірогідність кореляції (кореляційний аналіз Спірмена і Пірсона).

**Результати дослідження та їх обговорення**

Дебют НСV-інфекції, як правило, перебігав безсимптомно, без яскравої клінічної картини. Загальна тривалість хронічної фази процесу коливалася від 6 місяців до 12 років. Хронічний гепатит С відрізнявся широкою різноманітністю проявів – від маніфестних до субклінічних та інапарантних. У більшої частини хворих хронічний гепатит С мав латентний перебіг. Перші клінічні прояви ХГ були різними в залежності від тривалості латентної фази, ступеня ураження печінки, джерела інфекції, імунного статусу пацієнта. Маніфестація хронічного гепатиту С спостерігалася у вигляді астенічного (117 – 92,8 %) та диспептичного (107 – 84,9 %) синдромів. Специфічних скарг не відзначалось. Хворі скаржились на загальну слабкість, швидку стомлюваність, відчуття розбитості, зниження працездатності, інтересу до справ, апатію, порушення сну, а також погіршення апетиту, зниження маси тіла, відчуття важкості у правому підребер’ї. Найбільш частими були скарги на слабість (підвищену стомлюваність) і, як наслідок, зниження працездатності у хворих. Збільшення і ущільнення печінки поєднувалося зі збільшенням селезінки у 37,3 % хворих.

Хронічна НСV-інфекція приводить до значних змін в імунному статусі пацієнтів. У хворих на ХГС спостерігається відносний лімфоцитоз, проте абсолютна кількість лімфоцитів суттєво не змінюється. Аналіз клітинної ланки імунітету показав достовірну різницю кількості лімфоцитів із CD3 фенотипом. Кількість CD3-клітин, які у кров’яному руслі складають популяцію зрілих Т-лімфоцитів, у хворих на ХГС була знижена і становила 45,7±0,85 % проти 61,5±1,6 % у групі співставлення (р<0,001). Відомо, що лімфоцити з CD4 маркерами, які володіють характеристиками Т-хелперів/індукторів, через цитокіновий каскад у процесі міжклітинних взаємодій включають імунну відповідь на антиген, що потрапив до організму. Пригнічення експресії маркерних рецепторів Т-хелперів свідчить про їх функціональну недієздатність. Аналіз імунофенотипу лімфоцитів крові хворих на ХГС показав достовірне зниження експресії рецепторів CD4 у порівнянні із контрольними даними (27,3±1,1 % і 36,5±1,3 % відповідно, р<0,001). Зниження кількості CD4-лімфоцитів спостерігалось у 93 (73,8 %) пацієнтів. На відміну від CD4 відносний вміст цитотоксичних CD8 лімфоцитів дещо зростав (26,6±1,05 %), проте статистично вірогідно ці показники не відрізнялись від аналогічних параметрів у здорових донорів (23,1±0,8 %, р>0,05). Підвищення експресії антигенів CD8 було знайдено у 52 (41,2 %) осіб. Внаслідок Т-клітинного дисбалансу у пацієнтів із ХГС спостерігається зниження індексу імунорегуляції, тобто співвідношення субпопуляцій із маркерами CD4/CD8 (1,58±0,05 і 1,02±0,03 у здорових і хворих відповідно, р<0,001). Імунорегуляторний індекс менше за одиницю виявлений у 39,6 % випадків. Відносний вміст інших кілерних клітин, природних кілерів, із фенотипом CD16 у хворих на ХГС дещо знижується (7,9±0,65 % проти 12,3±0,9 % у контролі, р<0,05). Суперекспресія CD16 фенотипу була виявлена у 71 (56,3 %) пацієнта.

*Таблиця 2*

**Імунологічні показники у хворих на ХГС**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Імунологічніпоказники | Здорові донори(n=25) | ХГС (n=126) |
| Лейкоцити, 109/л | 6,58±0,31 | 5,4±1,3\* |
| Лімфоцити, % абс. | 32,8±0,92 | 41,4±0,52\* |
| 1,75±0,06 | 1,81±0,4 |
| CD3, % | 61,5±1,6 | 45,7±0,85\* |
| CD4, % | 36,5±1,3 | 27,3±1,1\* |
| CD8, %  | 23,1±0,8 | 26,6±1,05 |
| CD16, %  | 12,3±0,9 | 7,9±0,65\* |
| CD19, % | 11,4±0,8 | 16,5±0,98\* |
| CD4/CD8 | 1,58±0,05 | 1,02±0,03\* |
| IgA, г/л | 1,78±0,2 | 1,95±0,48 |
| IgM, г/л | 1,18±0,15 | 1,66±0,45\* |
| IgG, г/л | 11,5±0,9 | 25,2±1,4\* |

Примітка: \* – різниця показників достовірна у порівнянні

з показниками здорових людей (р<0,05).

 Паралельно дисрегуляції Т-клітинної ланки у хворих на ХГС спостерігається також помірна активація гуморального імунітету: відносна кількість В-лімфоцитів із фенотипом CD19 достовірно підвищується (16,5±0,98 % проти 11,4±0,8 % у групі співставлення, р<0,05). Було відзначено достовірне підвищення продукції імуноглобулінів IgG та IgM. У хворих на ХГС виявлена пряма тісна кореляційна залежність між вмістом В-лімфоцитів і рівнем продукції імуноглобулінів (R=0<75, p<0,05).

 Непрямий імунофлуоресцентний аналіз маркерів активації показав, що кількість клітин, які реагують із анти-CD25 МКАТ, у сумарній популяції лімфоцитів у хворих на ХГС достовірно порівняно з контролем знижується (табл.3). Відсоток CD25 клітин в середньому у групі хворих становив 8,7±0,5 % проти 13,4±1,1 % у здорових осіб (р<0,05). Рівень експресії CD25 маркера (рецептор ІЛ-2) був нижче референтної межи у 73 (57,9 %) хворих. Ще одним маркером ранньої активації є рецептор преплазматичних клітин CD38. У обстеженої групи пацієнтів спостерігалося суттєве, в 1,3 рази, підвищення відносної (21,3±0,7 %, р<0,05) кількості клітин із CD38 активаційним маркером у порівнянні з даними контрольної групи (16,2±0,6 %). Встановлено позитивний помірний зв’язок між вмістом Т-хелперів і активованих CD3-лімфоцитів (R=0,58, p<0,05) і тісний прямий зв’язок між експресією антигенів CD38 і CD19 (R=0,77, p<0,05).

*Таблиця 3*

**Експресія активаційних маркерів циркулюючими мононуклеарами периферійної крові хворих на ХГС**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | CD25 | CD38 | CD95 | HLA-DR |
| Донори, %  | 13,4±1,1 | 16,2±0,6 | 12,4±1,5 | 22,7±0,8 |
| ХГС, %  | 8,7±0,5\* | 21,3±0,7\* | 16±1,2\* | 18,3±0,6 |

Примітка: \* – різниця показників достовірна у порівнянні

з показниками здорових людей (р<0,05).

 Окрім маркерів ранньої активації нами була вивчена також експресія маркерів так званої пізньої активації – CD95 і HLA-DR. Аналіз експресії Fas (CD95) рецептора на поверхні сумарної фракції лімфоцитів хворих на ХГС показав значне підвищення відсотка клітин із фенотипом CD95 (16±1,2 % проти 12,4±1,5 % в контролі, р<0,05). Причому відсоток пацієнтів, у яких готовність до апоптозу була високою, становив 48,1 % (61 особа).

 Аналіз лімфоцитів, які мали на поверхні антигени HLA-DR, у хворих на ХГС показав зменшену їх експресію при вивчені відносних параметрів. Так відносне число лімфоцитів, які експресують маркери HLA-DR, становило 18,3±0,6 % проти 22,7±0,8 % в контролі. Однак ця різниця була поза межами статистичної вірогідності (р>0,05), хоча у 40 пацієнтів (31,7 %) цей показник виходив за межі референтного інтервалу.

 При досліджені спектра медіаторів імунної відповіді у хворих із маркерами HCV-інфекції були знайдені суттєві та різноспрямовані зміни вмісту багатьох цитокінів (табл.4). Хронічна інфекція викликає підвищення сироваткової концентрації основних прозапальних цитокінів IЛ-1β, ФНП-α та ІЛ-6 (105,1±19,9; 88,9±8,2 i 88,4±17,8 пкг/мл відповідно), які в 2,0, 7,1 i 2,5 рази перевищують контрольні показники (51,7±10,4, р<0,05; 12,5±4,1, р<0,01; 34,8±6,3, р<0,05, пкг/мл, відповідно). Встановлено помірну кореляційну залежність між рівнями IЛ-1β і ФНП-α (R=0,57, p<0,05). У хворих із клінічно маніфестними формами (62 пацієнта, 73,8 %) виявлені більш високі показники IЛ-1β та ФНП-α у порівнянні із субклінічними (22 пацієнта, 26,8 %) (125,3±7,6 і 97,4±5,6; 73,2±6,8 і 49,1±5,6 пкг/мл, р<0,05, р<0,05).

## **Таблиця 4**

## *Концентрація цитокінів у сироватці крові HCV-інфікованих пацієнтів (пкг/мл)*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Цитокіни** | **Група співставлення**(n=25) | **ХГС** (n=126) |
| ІФН-α, МО/мл (n=44) | ***116,7±7,2*** | ***656,3±73,5\**** |
| ІФН-γ, пкг/мл (n=44) | ***37,4±6,2*** | ***139,7±45,8\**** |
| ФНП-α, загальний (n=44) | ***12,5±4,1*** | ***88,9±8,2\**** |
| ***ФНП-α, біологічно активний (n=44)*** | ***4,8±2,8*** | ***31,7±4,0\**** |
| ***IЛ-1β***  | ***51,7±10,4*** | ***105,1±19,9\**** |
| ***ІЛ-2*** | ***36,9±8,8*** | ***71,8±15,6\**** |
| ***IЛ-4*** | ***52,1±8,2*** | ***558,9±45,7\**** |
| ***IЛ-6*** | ***34,8±6,3*** | ***88,4±17,8\**** |
| ***IЛ-10*** | ***13,1±1,4*** | ***20,1±4,9\**** |

 Примітка: \* – достовірна різниця у порівнянні з групою співставлення (р<0,05)

 На рівень цитокінів у сироватці крові суттєво впливають різноманітні фактори, перш за все стать, вік, вживання внутрішньовенних препаратів. Так, у жінок (36, 42,8 %) зареєстровані більш високі показники IЛ-1β та ІЛ-6 у порівнянні із чоловіками (116,3±8,8 і 103,4±9,5 проти 71,2±6,9 і 66,9±5,3 пкг/мл відповідно, р<0,05, р<0,05). У осіб до 25 років концентрація прозапальних цитокінів IЛ-1β і ФНП-α була вірогідно вище, ніж у осіб зрілого та похилого віку (153,2±11,7 і 121,5±9,8 проти 77,2±6,4 і 61,8±5,3 пкг/мл, р<0,05, р<0,05).

 Далі вивчався вміст прозапальних цитокінів у сироватці крові хворих із високою та низькою ферментативною активністю. Встановлено, що у хворих із високою активністю АлАТ/АсАТ (10 осіб, 11,9 %) концентрація IЛ-1β і ФНП-α перевищувала аналогічні показники решти хворих (161,3±10,5 і 127,6±8,1 проти 78,7±6,5 і 66,9±5,4 пкг/мл відповідно, р<0,05, р<0,05). У хворих на ХГС виявлялася помірна пряма кореляційна залежність між рівнями IЛ-1β і АлАТ (R=0,45, p<0,05).

 У хворих (38 чоловік) із значною білірубінемією (більше двох норм) секреція ІЛ-6 була більш високою, ніж у решти пацієнтів (127,4±8,1 проти 63,8±5,2 пкг/мл, р<0,05).

Була зроблена також спроба співставити рівень цитокінів залежно від генотипу вірусу, яким була інфікована людина. У хворих із 1b генотипом вірусу, який зустрічався найчастіше (75 пацієнтів), рівень експресії ІЛ-6 і ФНП-α був вище, ніж у хворих із 3а генотипом вірусу (104,8±10,3 і 108,2±7,5 проти 61,8±4,3 і 72,9±6,6 пкг/мл відповідно, р<0,05, р<0,05). Кореляційний зв’язок у цьому випадку мав помірне позитивне значення (R=0,38 i R=0,41, р<0,05, р<0,05). Це свідчить про більшу активність запального процесу в печінці в разі інфекції 1b генотипом вірусу. Виявлений також помірний кореляційний зв’язок між рівнями ІЛ-6 і ФНП-α (R=0,49, p<0,05), що може відображати стимулюючий вплив ФНП-α на продукцію ІЛ-6.

Ситуація з регуляторними цитокінами ІЛ-2 і ІФН-γ була прямо протилежна: високі показники частіше спостерігалися у хворих із 3а генотипом вірусу (141,4±12,5 і 175,2±19,3; 47,7±3,2 і 109,1±8,9 пкг/мл відповідно, р<0,05, р<0,05). Рівень позитивної кореляції був також помірним (R=0,37 i R=0,46, р<0,05, р<0,05).

Звертає на себе увагу висока концентрація визначального медіатора другого клону Т-хелперних клітин ІЛ-4. Середня концентрація його у сироватці крові хворих на ХГС становила 558,9±45,7 пкг/мл, що у 10,7 рази перевищує рівень контролю. Цей факт свідчить про різкий дисбаланс у функціюванні основних клонів Т-хелперних клітин, що приводить до активації гуморальної імунної відповіді, втім неадекватної, персистенції вірусу та хронізації інфекції. Відзначалася помірна кореляційна залежність між показниками ІЛ-4 та прозапальних цитокінів ІЛ-6 та ФНП-α (R=0,58 i R=0,54, p<0,05, p<0,05).

 Як зазначено, вплив ронколейкіну на перебіг ХГС вивчався на двох групах хворих по 10 осіб кожна. До складу першої групи хворих (монотерапія ронколейкіном) входило 5 чоловіків та 5 жінок віком від 17 до 35 років (середній вік становив 28,2±7,02 р.) з тривалістю захворювання в середньому 4,1±3,53 років (від 1 до 10 років). У 8 хворих цієї групи був виявлений генотип 1b вірусу і ще у двох – генотип 3а.

 Перед початком лікування у 8 хворих спостерігалось підвищення активності АлАТ (2,62±1,75 ммоль/г\*л). У 2 хворих АлАТ була в межах норми. АсАТ була підвищена у 6 хворих (1,26±0,76 ммоль/г\*л). Рівень віремії коливався від 104 до 105 копій/мл (у двох пацієнтів вірусне навантаження сягало 107 копій/мл). У більшості хворих спостерігалося зниження кількості Т-хелперів з фенотипом CD4+, яка в середньому становила 28,17±3,74 %, внаслідок чого зменшувався також ІРІ.

 Усі хворі одержали курсову дозу ронколейкіну (12,5 млн МО) протягом двох місяців на фоні базисної терапії.

 Ефективність терапії оцінювалася після завершення курсу лікування. На початку лікування у всіх хворих спостерігалась субфебрільна температура, у 6 пацієнтів відмічалося нестійке погіршення самопочуття (запаморочення, головний біль, помірне підвищення температури тіла, нудота, підвищення АТ), підвищення активності трансаміназ. Усі ці симптоми через 6-10 днів лікування зникали.

На протязі лікування відмічено зменшення диспепсичного та астено-вегетативного синдромів з 7 дня, нормалізація розмірів печінки з 15 дня, зникнення позапечінкових проявів, покращення самопочуття.

В біохімічному аналізі крові спостерігалося зниження активності АлАТ (1,44±1,11 ммоль/г\*л, у 4 хворих – нормалізувалась) і нормалізувалась у 9 хворих АсАТ (0,54±0,41 ммоль/г\*л), зменшення рівня білірубіну, підвищення рівня альбуміну крові, зниження рівня глобулінів.

 При дослідженні рівня цитокінів виявлено зниження рівня ФНПα (загального і вільного), IЛ-1β, підвищення рівнів IЛ-2, IЛ-6, ІФНα, ІФНγ (табл.5). Спостерігалися також зміни в субпопуляційному складі Т-лімфоцитів: незначне зниження CD3, підвищення рівня СD4, різке зниження CD8 та, відповідно, підвищення ІРІ, досить суттєве підвищення кількості NK-клітин. Усі ці зміни свідчать про підсилення клітинної та неспецифічної ланок імунітету.

*Таблиця 5*

**Динаміка вмісту цитокінів в сироватці крові хворих на ХГС під**

**час монотерапії ронколейкіном (n=10)**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | До лікування | Після лікування |
| ФНП-α (загальний), пг/мл | 88,2±26,3 | 48,7±29,8\* |
| ФНП-α (вільний), пг/мл | 38,8±10,9 | 15,6±12,1\* |
| IЛ-1β, пкг/мл | 44,9±8,9 | 40,8±8,7 |
| IЛ-2, пкг/мл | 71,9±15,3 | 102,4±21,1\* |
| IЛ-6, пкг/мл | 29,3±17,0 | 50,7±18,2\* |
| IФН-α, МО/мл | 670,2±69,8 | 784,1±88,4\* |
| IФН-γ, пкг/мл | 139,7±45,8 | 155,0±44,1 |

Примітка: \*– достовірна різниця у порівнянні з початком лікування (р<0,05)

 Аналіз вірусного навантаження після закінчення терапії показав зниження віреміїї в середньому на 3 порядки. У двох хворих після закінчення терапії вірус в крові не визначався. Втім, у однієї пацієнтки через 6 місяців знову зв’явилася віремія, в той час як у другої вже протягом 6 місяців вірус у крові не визначається. У двох пацієнтів рівень вірусного навантаження не змінився. З метою підвищення ефективності лікування у подальшому ми використали комбіновану терапію ронколейкіном та інтерфероном альфа-2b.

 Друга група хворих складала 10 пацієнтів (9 чоловіків і 1 жінка), хворих на ХГС, віком від 17 до 45 років (середній вік становив 28,1±6,96 років), середній термін захворювання 2,66±1,77 років (від 1 до 6 років). У всіх спостерігалось підвищення активності АлАТ (2,36±1,69 ммоль/ч\*л). Рівень віремії визначався кількісним методом і в середньому складав 2,4\*105 копій/мл (коливався від 3200 копій/мл до 1,7\*107 копій/мл). При генотипуванні виявлений генотип 1b (7 випадків) та генотип 3 а (3 випадки). У більшості хворих спостерігалось зниження кількості Т-хелперів, яка в середньому складала 28,17±3,74 %. Зменшувався також ІРІ. При дослідженні цитокінового профілю у крові хворих цієї групи з маркерами хронічної HCV-інфекції знайдені підвищені концентрації IФН обох типів (IФНα – 670,2±69,8 МО/мл, IФН– 139,7±45,8 пкг/мл) і прозапальних цитокінів: ФНПα, IЛ-2, IЛ-6, (IЛ-2 – 71,9±15,3 пг/мл, IЛ-6 – 29,3±17,0 пг/мл).

 Усі хворі отримували ронколейкін у кількості 12,5 млн МО на курс (5 інфузій по 1 млн МО та 15 інфузій по 500 тис МО) шляхом в/в крапельного повільного введення через 2 дні та препарати інтерферону-α2в (лаферобіон) (по 3 млн МО в/м тричі на тиждень на протязі 3 місяців). На початку лікування у всіх хворих відмічався грипоподібний синдром (підвищення температури до 38-39 С, нездужання, головокружіння).

 Результати лікування: у всіх хворих відзначалася нормалізація активності трансаміназ, імунограми (підвищення рівня Т-хелперів та ІРІ). Рання вірусологічна відповідь (зникнення РНК ВГС з крові) відмічена у 70 % пацієнтів. У 3 хворих зафіксовано зниження вірусного навантаження, але менш ніж на 2 log.

 При дослідженні цитокінового профілю у крові хворих після лікування спостерігалося підвищення концентрації ІФН обох типів (IФНα – 792,1±86,2 МО/мл, IФН– 198,2±54,1 пкг/мл) і зниження вмісту прозапальних цитокінів: ФНПα, IЛ-2, IЛ-6, (ФНПα – 47,2±11,9 пг/мл, IЛ-6 – 17,2±7,3 пг/мл). Водночас у групі хворих, що отримували лише базисну терапію, не було зафіксовано змін рівнів цитокінів, вірусного навантаження, вмісту імуноцитів.

 Після отримання ранньої вірусологічної відповіді хворі продовжували лікування комбінацією інтерферона і рибавірина.

#### ВИСНОВКИ

 У дисертаційній роботі наведено теоретичне узагальнення і нове вирішення актуальної наукової задачі, що полягає у встановленні імунопатогенетичних закономірностей HCV-інфекції, які приводять до її хронізації й довічної персистенції вірусу гепатиту С, а також в патогенетичному обгрунтуванні включення в комплексну терапію хворих на ХГС рекомбінантного аналогу ІЛ-2 (ронколейкіну) та аналізі його клінічної ефективності.

1. У 33,0 % хворих не вдалося встановити зв’язок захворювання з певним фактором ризику інфікування. Дебют НСV-інфекції перебігав безсимптомно, без яскравої клінічної картини. В клінічній картині домінували гепатомегалія (100,0 %), астенічний (92,8 %) та диспепсичний (85,7 %) синдроми. З позапечінкових проявів (23,8 % хворих) найчастіше спостерігалася анемія (23,3 %), червоний плоский лишай (20,0 %), та автоімунний тиреоідит (33,3 %). Специфічні зміни в загальному аналізі крові не визначались.

2. Для HCV-інфекції в цілому характерне зменшення вмісту в крові зрілих Т-лімфоцитів, які несуть маркер CD3+, і субпопуляції Т-хелперів із фенотипом СD4+ (73,8 % хворих), в той час як кількість Т-клітин кілерів в цілому не змінюється (кількість ЦТЛ із фенотипом CD8+ дещо збільшується (41,2 % хворих), а NK-клітин із маркером CD16+ – падає майже вдвічі (56,3 % хворих). Це приводить до суттєвого зменшення імуно-регуляторного індексу (39,6 % хворих). Вміст В-лімфоцитів при хронічній HCV-інфекції зростає на 30-40 %. Значимо також зростає продукція імуноглобулінів.

3. Встановлена одночасна суперекспресія імунорегуляторного цитокіну ІФН-γ (139,7±45,8 пкг/мл) і ключового цитокіну Th2-клону Т-лімфоцитів ІЛ-4 (558,9±45,7 пкг/мл), що приводить до виснаження імунної системи: спостерігається слабка антитільна віруснейтралізуюча відповідь в той час, як ефект підвищеної продукції ІФН-γ не реалізується належним чином і в потрібному обсязі. Домінування ІЛ-4 визначає весь спектр імунопатологічних процесів, наслідком яких є персистенція вірусу і хронізація інфекції. Одночасне включення функцій Th1 i Th2 гальмує розвиток будь-якої форми імунної відповіді й приводить до розвитку імунодефіциту. Показано, що кількість одного з найважливіших прозапальних цитокінів ФНП-α, не співпадає з очікуваною величиною біологічної активності. Це свідчить про наявність в крові систем, які обмежують реалізацію біологічних ефектів ФНП-α.

4. При призначенні ронколейкіну у більшості випадків (89,7 %) хворі відзначали покращання самопочуття на тлі лікування. Як моно-, так і комбінована (із ІФН-α2в – лаферобіоном) терапія ронколейкіном сприяє активації Т-клітинної ланки імунітету: збільшенню вмісту Т-лімфоцитів та їх CD4+ субпопуляції (40,4 % хворих), зменшенню кількості В-лімфоцитів та рівней імуноглобулінів. Використання ронколейкіну приводить до зменшення дисбалансу цитокінової регуляції імунної відповіді: зменшується рівень ФНП-α (79,4 % хворих) й підвищується концентрація ІЛ-2 (75,4 % хворих). При одночасному порівняльному аналізі використання ронколейкіну для моно- і комбінованої терапії ХГС серйозних побічних ефектів, які б примусили призупинити терапію, зареєстровано не було.

5. Повна відповідь (біохімічна й вірусологічна) досягнута у 60 % пацієнтів. Рекомендована терапія з використанням ронколейкіну у наступних випадках:

* пацієнтів із генотипом 1b вірусу, який погано піддається стандартній ІФН терапії
* коли немає ефекту після комбінованої терапії із інтерфероном та рибавірином
* якщо є непереносимість до одного з компонентів комбінованої терапії рибавірином і інтерфероном або спостерігається розвиток ускладнень при їх використанні

#### ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

#### **1. Показання для використання ронколейкіну включають наявність 1b генотипу вірусу ГС, відсутність ефекту після комбінованої терапії інтерфероном та рибавірином, непереносимість до ІФН або рибавірину чи розвиток ускладнень при їх використанні.**

#### **2. При лікуванні хворих на ХГС зі слабкою та помірною активністю патологічного процесу доцільне використання монотерапії ронколейкіном.**

 3. Ронколейкін пропонується у складі комбінованої терапії за схемою: 12,5 млн МО на курс (5 інфузій по 1 млн МО та 15 інфузій по 500 тис МО) вводиться в/в крапельно повільно через 2 дні разом із препаратами інтерферону-α2в (лаферобіон) (по 3 млн МО в/м тричі на тиждень на протязі 3 місяців).

**СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

1. Дьяченко П.А. Діагностика і терапія вірусного гепатиту С / П.А. Дьяченко // Вісник СумДУ.-2004.-№ 11 (70).-С. 126-137.
2. Дьяченко П.А. Дифференцировка Т-лимфоцитов при хронических вирусных гепатитах / П.А. Дьяченко, Н.Д. Чемич // Вісник СумДУ.-2004.-№7(66).-С.173-184. (Здобувач здійснив аналіз літературних джерел, дослідження матеріалу, узагальнення результатів і сформулював висновки).
3. Дьяченко П.А. Интерфероны в патогенезе и лечении вирусных гепатитов / П.А. Дьяченко, А.Г. Дьяченко // Вісник СумДУ.-2005.-№7 (79).-С.35-44. (Здобувач здійснив пошук літературних джерел, провів аналіз матеріалу та узагальнення результатів і сформулював висновки).
4. Вміст інтерферону і фактору некрозу пухлин альфа у сироватці крові хворих на хронічні вірусні гепатити / [П.А. Дьяченко, Ю.Й. Кудрявець, А.Г. Дьяченко, А.О. Сніцар] // Вісник СумДУ.-2005.-№3(75).-С.111-117. (Здобувачем зібрано матеріал, проведене його дослідження, описання і аналіз отриманих результатів).
5. Сироватковий рівень інтерферону і фактора некрозу пухлин у хворих, хронічно інфікованих вірусами гепатиту В та С / [П.А. Дьяченко, Ю.Й. Кудрявець, А.Г. Дьяченко, А.Д. Вовк] // Сучасні інфекції,-2005.-№1.-С.24-29. (Здобувачем зібрано матеріал, проведене його дослідження, статистична обробка та описання і узагальнення отриманих результатів).
6. Аутоиммунные процессы при вирусных гепатитах / [П.А. Дьяченко, H.A. Галушко, А.Г. Дьяченко, Е.В. Коверга] // Імунол. та алергол.-2003.-№1.-С.22. (Здобувачем зібрано матеріал, проведене його дослідження, описання і аналіз отриманих результатів).
7. Дьяченко П.А. Нарушение регуляции иммунного ответа при вирусных гепатитах / П.А. Дьяченко // Мат. II Республіканської науково-практичної конференції студентів та молодих вчених. Сумы, 2003, с.92-93
8. Дьяченко П.А. Клинические особенности хронических вирусных
гепатитов В и С / П.А. Дьяченко // Мат. III Республіканської науково-практичної конференції студентів та молодих вчених. Суми, 2004, С. 124-125.
9. Дьяченко П.А., Цитокинемия в патогенезе хронических вирусных гепатитов / П.А. Дьяченко, А.Г. Дьяченко // Мат. 10-й Росс.конф. «Гепатология сегодня», 28-30.03.05, М.: Росс.ж.гастроэнтерол.гепатол.-2005.-Т.ХУ, №1.-С.12. (Здобувачем зібрано матеріал, проведене його дослідження, статистична обробка та описання і узагальнення отриманих результатів).
10. Дьяченко А.А. Содержание интерферона и фактора некроза опухоли в крови больных хроническими вирусными гепатитами / А.А. Дьяченко, П.А. Дьяченко // Мат. V съезда гастроэнтерол. России, М.,3-6.02.2005.-С.237-238. (Здобувачем зібрано матеріал, проведене його дослідження, статистична обробка та описання і узагальнення отриманих результатів).
11. Дьяченко А.А. Вирусспецифическая продукция цитокинов мононуклеарами периферической крови при хронической инфекции вирусами гепатита В и С / А.А. Дьяченко, П.А. Дьяченко // Мат. V съезда гастроэнтерол. России, М.,3-6.02.2005.- С.238-240. (Здобувачем зібрано матеріал, проведене його дослідження, статистична обробка та описання і узагальнення отриманих результатів).
12. Дьяченко П.А. Сходство иммунопатогенетических мотивов персистенции гепатотропных вирусов / П.А. Дьяченко, А.Г. Дьяченко // Мат. VI Всеросс.конф. «Вирусные гепатиты», 24-26.05.2005.-С.88-89. (Здобувачем зібрано матеріал, проведене його дослідження, статистична обробка та описання і узагальнення отриманих результатів).
13. Дьяченко П.А. Сучасний погляд на патогенез гепатиту С. Досвід лікування хворих Ронколейкіном / П.А. Дьяченко, А.Д. Вовк, А.Г. Дьяченко // Мат. VII з'їзду інфекціоністів України «Інфекційні хвороби - загальномедична проблема».-26-29 вересня 2006 р. Миргород.-С.42-43.
14. Дьяченко П.А. Содержание провоспалительных цитокинов (ИЛ-2, ИЛ-6, ФНО-а,) и иммунокомпетентных клеток у больных хроническими вирусными гепатитами (ХВГ) / П.А. Дьяченко, А.Д. Вовк, А.Г. Дьяченко // Мат. Российской научно-практической конференции, посвященной 110-летию кафедры инфекционных болезней Военно-медицинской академии им. СМ. Кирова "Инфекционные болезни: проблемы здравоохранения и военной медицины", С.-Пб., 2006, С. 101-102. (Здобувач здійснював пошук літератури, проводив дослідження й приймав участь в аналізі та у загальненні результатів).
15. Дьяченко П.А. Досвід застосування препарату Ронколейкіну у хворих на хронічний гепатит С. / П.А. Дьяченко, А.Д. Вовк // Мат. науково-практичної конференції і пленуму Асоціації інфекціоністів «Хвороби печінки в практиці інфекціоніста», Донецьк, 2007, С.40-42. (Здобувач здійснив пошук літературних джерел, провів аналіз матеріалу та узагальнення результатів і сформулював висновки).
16. Дьяченко П.А., Федорченко С.В., Дьяченко А.Г. Эффективность комбинированной терапии препаратами рекомбинантного интерлейкина-2 и рекомбинантного интерферона альфа-2в у больных с хронической НСV-вирусной инфекцией / Мат. Международного Евро-азиатского конгресса по инфекционным болезням, 7-го Симпозиума гепатологов Беларуси. 4-6 июня 2008 г. Витебск. С. 71-72. (Здобувач здійснив пошук літературних джерел, провіє аналіз матеріалу та узагальнення результатів і сформулював висновки).
17. Методика застосування «Ронколейкіну» при хронічному гепатиті С / [Дьяченко П.А., Вовк А.Д., Федоченко С.В., Ясеновий С.П.] // Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я №220-2007. К., 2007.- 4 с. (Здобувачем зібрано матеріал, проведене його дослідження, статистична обробка та описання і узагальнення отриманих результатів)
18. Методика застосування комбінованої терапії «Ронколейкіном» та «Лаферобіоном» при хронічному гепатиті С / [Дьяченко П.А., Вовк А.Д., Федоченко С.В., Ясеновий С.П.] // Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я №221-2007. К., 2007 - 4 с. (Здобувачем зібрано матеріал, проведене його дослідження, статистична обробка та описання і узагальнення отриманих результатів).

**АНОТАЦІЯ**

 *Дьяченко П.А.* **Клініко-патогенетичні особливості і оптимізація терапії у хворих на хронічний гепатит С.–** Рукопис.

 Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.01.13 – інфекційні хвороби. – ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського АМН України», Київ, 2009.

 Дисертація присвячена вивченню механізмів патогенезу хронічного гепатиту С і шляхів оптимізації терапії хворих на ХГС. Доведено, що хронічна HCV-інфекція тісно зв’язана з порушенням балансу регуляторних цитокінів, яке виникає внаслідок слабкої й неефективної відповіді вірусспецифічного клону Th1 лімфоцитів, що в свою чергу, обумовлено низкою обставин, серед яких інфекція й ураження найважливіших імуноцитів першої ланки імунної відповіді – професійних АПК (дендритних клітин та макрофагів), продукція вірусом інгібіторів диференціровки наївних Т лімфоцитів, пригнічення апоптозу інфікованих клітин та його стимуляція у відношенні ефекторів імунної відповіді, формування численних квазивидів у того ж самого пацієнта, що приводить до виснаження імунної системи й анергії. Показано, що при ХГС підвищується експресія цитокінів обох клонів Т-хелперів. Так, концентрація ІФН-γ зростає майже у 4 рази, ІЛ-2 – вдвічі, в той же час середня концентрація визначального медіатора другого клона Т-хелперних клітин ІЛ-4 у сироватці крові хворих на ХГС становила 558,9±45,7 пкг/мл, що у 10,7 разів перевищує рівень контролю. Хронічна інфекція викликає підвищення сироваткової концентрації основних прозапальних цитокінів IЛ-1β, ФНП-α та ІЛ-6 (105,1±19,9; 88,9±8,2 i 88,4±17,8 пкг/мл відповідно), які в 2,0, 7,1 i 2,5 рази перевищують контрольні показники (51,7±10,4, р<0,05; 12,5±4,1, р<0,01; 34,8±6,3, р<0,05, пкг/мл, відповідно). Стимуляція мононуклеарів периферійної крові (МПК) вірусспецифічними антигенами приводила лише до незначного підвищення синтезу основних цитокінів in vitro, що свідчить про виснаження адаптаційних механізмів імунної відповіді і падіння антивірусної реактивності.

 Проведений аналіз можливості використання Ронколейкіну для лікування ХГС показав його хорошу переносимість, відсутність серйозних побічних ефектів, порівняно високу противірусну активність. Біохімічна відповідь була досягнута у всіх хворих, які отримували комбіновану терапію (ІФН плюс Ронколейкін), рання вірусологічна відповідь була досягнута у 70 % хворих. Монотерапія Ронколейкіном приводила до нормалізації рівня амінотрансфераз у 90 % пацієнтів, у 80 % хворих вірусне навантаження зменшувалося в середньому на 3 логарифми. Після закінчення лікування в крові двох пацієнтів вірус не визначався. Через 6 місяців після закінчення лікування стабільна вірусологічна відповідь досягнута у одного пацієнта, у решти рівень віремії не підвищувався.

**ANNOTATION**

 *D'yachenko P.* **Clinical and pathogenetic features and optimization of therapy for patients with chronic hepatitis C .-** Manuscript.

 Dissertation for the scientific degree of Candidate of medical sciences on speciality 14.01.13 – Infectious diseases. – State establishment “L.V. Gromashevsky Memorial Institute of Epidemiology and Infectious diseases of AMS Ukraine”, Kyiv, 2009.

 Dissertation is devoted to the problems of pathogenesis of chronic hepatitis C. It is well-proven that chronic HCV-infectious is closely associated with violation of balance of regulator cytokines, which arises up as a result of weak and uneffective immune answer of the virus specific Th1 clones of lymphocytes, that in the turn, is a result of the some reasons among which infection and defeat of major immunocytes of the first line of immune answer - professional APC (dendritic cells and macrofages), virus produced inhibitors of differentiation of naive Th lymphocytes, suppression of apoptosis of the virus infected cells and his stimulation in the relation of effectors of immune answer, forming of numerous quasispecies in a that patient which results in exhaustion of the immune system and anergy. It is routined that expression of cytokines of both clones of Т-helpers rises at HCV. In fact, the level of IFN-γ is higher almost in 4 times, IL-2, - twice. At the same time the average concentration of the Th2 cells main cytokine IL-4 in the blood sera of patients with HCV was 558,9±45,7 pg/ml, that in 10,7 times as much as a control level. A chronic infection causes the increase of blood serum concentration of basic proinflammatory cytokines IL-1β, TNF-α, and IL-6 (105,1±19,9; 88,9±8,2 and 88,4±17,8 pg/ml accordingly) that in 2,0, 7,1 and 2,5 times exceed control indexes (51,7±10,4, р<0,05; 12,5±4,1, р<0,01; 34,8±6,3, р<0,05, pg/ml, accordingly). Stimulation of mononuclear cells of peripheral blood (MPC) by virus specific antigens resulted only in the insignificant increase of basic cytokines synthesis in vitro, that lead to exhaustion of adaptation mechanisms of immune answer and falling of anti-virus reactivity.

 The analysis of possibility to use roncoleukin for treatment of CHC showed him good bearableness, absence of serious side effects, comparatively high antiviral activity. A biochemical answer was attained for all patients who got the combined therapy (IFN plus roncoleukin), an early virologic answer was attained in 70 % patients. Monotherapy with roncoleukin resulted in normalization of aminotransferase activity in 90 % patients, in 80 % patients the viral loading diminished on the average on 3 logarithms. Upon termination of treatment in blood of two patients a virus was not determined. In 6 months upon termination of treatment the stable virologic answer was obtained in one patient, in others the virus level did not raise.

**АННОТАЦИЯ**

 *Дьяченко П.А.* **Клинико-патогенетические особенности и оптимизация терапии у больных хроническим гепатитом С.–** Рукопись*.*

 Диссертация на получение научной степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.13 – инфекционные болезни. – ГУ «Институт эпидемиологии и инфекционных болезней им. Л.В. Громашевского АМН Украины», Киев, 2009.

 Диссертация посвящена изучению механизмов патогенеза хронического гепатита С. Доказано, что хроническая HCV-інфекція тесно связана с нарушением баланса регуляторных цитокинов, которое возникает в результате слабого и неэффективного ответа вирусспецифического клона Th1 лимфоцитов, что в свою очередь, обусловлено рядом обстоятельств, среди которых инфекция и поражение важнейших иммуноцитов первого звена иммунного ответа – профессиональных АПК (дендритных клеток и макрофагов), продукция вирусом ингибиторов диференцировки наивных Т лимфоцитов, подавление апоптоза инфицированных клеток и его стимуляция в отношении эффекторов иммунного ответа, формирования многочисленных квазивидов у того же пациента, что приводит к истощению иммунной системы и анергии. Показано, что при ХГС повышается экспрессия цитокинов обоих клонов Т-хелперів. Так, концентрация ИФН-λ растет почти в 4 раза, ИЛ-2, – вдвое, в то же время средняя концентрация определяющего медиатора второго клона Т-хелперных клеток ИЛ-4 в сыворотке крови больных ХГС составляла 558,9±45,7 пкг/мл, что в 10,7 раз превышает уровень контроля. Хроническая инфекция вызывает повышение сывороточной концентрации основных провоспалительных цитокинов IЛ-1β, ФНО-α и ИЛ-6 (105,1±19,9; 88,9±8,2 и 88,4±17,8 пкг/мл соответственно), которые в 2,0, 7,1 и 2,5 раза превышают контрольные показатели (51,7±10,4, р<0,05; 12,5±4,1, р<0,01; 34,8±6,3, р<0,05, пкг/мл, соответственно). Стимуляция мононуклеаров периферической крови (МПК) вирусспецифическими антигенами приводила лишь к незначительному повышению синтеза основных цитокинов in vitro, что свидетельствует об истощении адаптационных механизмов иммунного ответа и падения антивирусной реактивности.

 Проведен анализ возможности использования ронколейкина для лечения ХГС. Все больные получали ронколейкин в количестве 12,5 млн МО на курс (5 инфузий по 1 млн МО и 15 инфузий по 500 тыс. МО) путем в/в капельного медленного введения через 2 дня и препараты интерферона-α2в (лаферобион) (по 3 млн МО в/м трижды в неделю в течение 3 месяцев). Показана его хорошая переносимость, отсутствие серьезных побочных эффектов. В начале лечения у всех больных отмечался гриппоподобный синдром (повышение температуры до 38-390 С, плохое самочувствие, головокружение). Однако серьезных побочнях эффектов, которые вынудили бы прервать лечение, зарегестрировано не было. Более того, в большинстве случаев (89,7 %) больные отмечали улучшение самочувствия на фоне лечения.

Результаты лечения с применением ронколейкина: биохимический ответ был достигнут у всех больных, которые получали комбинированную терапию (ИФН плюс ронколейкин), ранний вирусологический ответ был достигнут у 70 % больных. Монотерапия ронколейкином приводила к нормализации уровня аминотрансфераз у 90 % пациентов, у 80 % больных вирусная нагрузка уменьшалась в среднем на 3 логарифма. По окончании лечения в крови двух пациентов вирус не определялся. Через 6 месяцев по окончании лечения устойчивый вирусологический ответ достигнут у одного пациента, у остальных уровень виремии не повышался. Как моно-, так и комбинированная (с лаферобионом) терапия ронколейкином приводит к активации Т-клеточного звена иммунной системы (увеличению содержания в крови 40 % больных Т-лимфоцитов и их CD4+ субпопуляции, уменьшению количества В-лимфоцитов и концентрации иммуноглобулинов. Использование ронколейкина приводит к уменьшению дисбаланса цитокиновой регуляции иммунного ответа: уменьшается уровень ФНО-α (79,4 % больных) и повышается концентрация ИЛ-2 (75,4 % больных).

 Рекомендована терапия с использованием ронколейкина таких категорий пациентов: с генотипом 1b вируса, который плохо поддается стандартной ИФН терапии, не ответивших на комбинированную терапию с интерфероном и рибавирином, в случае непереносимости одного из компонентов комбинированной терапии рибавирином и ИФН или в случае развития ослонений при их использовании.

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ**

 АПК – антиген презентуючи клітини

 ВГВ – вірусний гепатит В

 ВГС – вірусний гепатит С

 ГГС – гострий гепатит С

 ІЛ – інтерлейкін

 ІФН – інтерферон

 МКАТ – моноклональні антитіла

 МПК – мононуклеари периферичної крові

 ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

 ФНП – фактор некрозу пухлин

 ХГС – хронічний гепатит С

 ЦТЛ – цитотоксичні Т-лімфоцити

 CD – кластер диференціації

 HCV – вірус гепатиту С

 NK – природні цитотоксичні клітини (кілери)

 Th – Т-(лімфоцити)-помічники

 Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>