



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **47781** (13) **A**
(51) **B 6 A61B5/00,5/145,A61K38/21**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ**ОПИС**
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту**(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ ІМУНОЛОГІЧНИХ ПОРУШЕНЬ ПРИ ХРОНІЧНОМУ ГЕПАТИТІ С**

1

2

(21) 2001096298

(22) 13 09 2001

(24) 15 07 2002

(46) 15 07 2002, Бюл. № 7, 2002 р

(72) Копіуш Ольга Ігоревна, Аршинов Павло Спиридонович

(73) КРИМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ ІМ С І ГЕОРГІЄВСЬКОГО(57) Спосіб діагностики імунологічних порушень
при хронічному гепатиті С, який включає
дослідження специфічних вірусу гепатиту С анти-

тіл класів М і G методом імуноферментного аналізу з одночасним визначенням показників імунологічного статусу, який відрізняється тим, що проводять дослідження додаткових імунологічних показників із застосуванням методу непрямой реакції поверхневої імуофлюоресценції з використанням моноклональних антитіл, а також досліджують функціональний стан нейтрофілів шляхом підрахунку фагоцитарного індексу, фагоцитарного числа і показника завершеності фагоцитозу

Винахід стосується медицини, а саме, інфекційних хвороб, і може бути використаний для діагностики імунологічних порушень при хронічному гепатиті С

Відомим є спосіб діагностики імунологічних порушень при хронічному гепатиті С (В В Серов, С Д Подымова, Т Н Постникова Морфологическое состояние печени больных хроническим гепатитом при нормальном уровне трансаминаз // Росс журнал гастроэнтерологии, гепатологии и

колопроктологии -1999 -т IX, №4 - С 45 - 47), який заключається у визначенні методом імуноферментного аналізу специфічних антитіл до різних антигенів вірусу гепатиту С з розподілом на класи М та G, з підтвердженням позитивного тесту імуноферментного аналізу в полімеразній ланцюговій реакції і гістологічними дослідженнями пунктів печінки

Ознаками, що співпадають з суттєвими ознаками запропонованого способу, є визначення спе-

(13) **A**(11) **47781**(19) **UA**

цифічних вірусу гепатиту С антитіл класів М і G методом імуоферментного аналізу

Причинами, що перешкоджають досягненню очікуваного технічного результату (підвищення точності діагностики), є відсутність інформації про імунологічні порушення в організмі хворого, необхідність спеціального устаткування для узяття біопсійного матеріалу на дослідження, інвазивність методик, громіздкість способу

За прототип обрано спосіб діагностики імунологічних порушень при хронічному гепатиті С (Клименко Ж.Б. Клініко-епідеміологічні особливості гепатиту С. Автореф. дис. канд. мед. наук, 14.01.13 / КНДІЕХ ім. Л.В. Громашевського -ДО, 1999 -19 с.), який заключається у визначенні специфічних вірусу гепатиту С антитіл класів М та G методом імуоферментного аналізу і основних імунологічних показників методом розеткоутворення з еритроцитами барана (Е-РҮК) та визначенням кількості Т-хелперів, Т-супресорів, імунорегуляторного індексу (ІРІ), імуноглобуліну G, рівня циркулюючих імунних комплексів (ЦІК).

Ознаками, які співпадають з суттєвими ознаками запропонованого способу, є визначення специфічних вірусу гепатиту С антитіл класів М та G методом імуоферментного аналізу з одночасним дослідженням показників імунологічного статусу

Причинами, що перешкоджають досягненню очікуваного технічного результату (підвищення точності діагностики), є неповний перелік імунологічних показників, що свідчать про ступінь імунопатології, визначення досліджуваних показників Т- і В-панки імунітету недостатньо точним методом розеткоутворення з еритроцитами барана, використання теофілінового тесту для визначення субпопуляцій Т-хелперів і Т-супресорів, при проведенні якого бувають погрешності, відсутність даних про функціональний стан нейтрофілів

В основу винаходу поставлена задача вдосконалення способу діагностики імунологічних порушень при хронічному гепатиті С шляхом визначення поряд зі специфічними антитільними маркерами гепатиту С більшої кількості імунологічних показників, що дозволяє досягти очікуваний технічний результат підвищити точність діагностики імунологічних порушень при хронічному гепатиті С, що свідчать про ступінь імунопатології, прогнозувати перебіг захворювання і підбирати лікування

Поставлена задача вирішується тим, що в запропонованому способі діагностики імунологічних порушень при хронічному гепатиті С, який включає дослідження специфічних вірусу гепатиту С антитіл класів М та G методом імуоферментного аналізу з одночасним визначенням показників імунологічного статусу, згідно винаходу, проводять дослідження додаткових імунологічних показників із застосуванням методу непрямої реакції поверхневої імуофлюоресценції з використанням мишачих моноклональних антитіл, а також досліджують функціональний стан нейтрофілів шляхом підрахунку фагоцитарного індексу, фагоцитарного числа і показника завершеності фагоцитозу

Між сукупністю суттєвих ознак способу діагностики, імунодефіциту при хронічному гепатиті С,

що заявляється і технічним результатом, який може бути досягнутим, проявляється наступний причинно-наслідковий зв'язок визначення додаткових імунологічних показників поряд з маркерами гепатиту С забезпечує одержання більш точного діагностичного ефекту, а використання методу непрямої реакції поверхневої імуофлюоресценції з використанням мишачих моноклональних антитіл до антигенів лімфоцитів CD3, CD4, CD8, CD22, CD25, CD16 для визначення їх субпопуляційного складу дозволяє найбільш точно простежити імунологічні зрушення в організмі хворого, необхідні для корекції лікування, при відсутності вищеперелічених ознак технічний результат недосяжний

Запропонованим способом обстежено 25 хворих на хронічний гепатит С помірної активності у віці 20 - 45 років. Отримані дані порівнювались з показниками 20 хворих на хронічний гепатит С помірної активності такої ж вікової групи, отриманими при обстеженні способом-прототипом. В групі хворих, імунологічні показники котрої досліджувались методом Е-РҮК, спостерігались наступні зміни: зниження Т-лімфоцитів, виражена гіперсупресія, значне зниження Т-хелперів і, як наслідок, зменшення імунорегуляторного індексу, а також збільшення рівня ЦІК. В той же час в аналогічній групі хворих, обстежених методом з використанням моноклональних антитіл та одночасним визначенням фагоцитарної активності нейтрофілів, виявлено зниження Т-лімфоцитів, значне зниження CD4, помірне зниження CD8, помірне зниження імунорегуляторного індексу, а також збільшення кількості CD25, рівня ЦІК і зниження CD22, CD16 та виражене пригнічення показників фагоцитарної активності нейтрофілів. Аналізуючи отримані результати, можна сказати, що запропонований спосіб діагностики дозволяє виявити більш виражені імунні порушення в організмі хворого

Спосіб винаходу заключається в наступному

Хворим на хронічний гепатит С при надходженні в стаціонар проводять дослідження маркерів вірусного гепатиту С класів М та G, а також показників імунологічного статусу: рівень CD3, CD4, CD8, CD16, CD22, CD25, нульових лімфоцитів у непрямої реакції поверхневої імуофлюоресценції з використанням мишачих моноклональних антитіл до даних антигенів, рівня циркулюючих імунних комплексів методом преципітації з 3,5% розчином поліетилєнґліколя і оцінюють функціональний стан нейтрофілів шляхом підрахунку фагоцитарного індексу, фагоцитарного числа і показника завершеності фагоцитозу

Застосування способу ілюструється наступними прикладами

Приклад 1. Хвора Г., 1974 р.н., звернулася за консультативною допомогою 2.03.2001 на приймальне відділення 7-ї міської лікарні зі скаргами на виражену невмотивовану слабкість, зниження апетиту, ломоту в тілі, постійну субфебрильну температуру, вагу в правому підбер'ї. Подібні явища турбують протягом останніх 4 - 5 місяців, із приводу чого зверталася до різних фахівців. У хворої підозрювали системне захворювання, але після ретельного обстеження діаг-

ноз колагеноза був відкинтий 23.02.2001 хворий у комплексному обстеженні було проведено дослідження крові на маркери вірусних гепатитів виявлені анти-HCV Ig G 2,3, при нормі до 0,35, і анти-HCV Ig M 0,9, при нормі до 0,35, загальний білірубін 9,8мкмоль/л, АлАТ 1,9ммоль/гхл. Був поставлений діагноз хронічний гепатит С, безжовтянична форма, помірно активності. Імунологічні показники, досліджені методом розеткоутворення, наведені в таблиці 1.

Таблиця 1

Показник	Показник хворого	Норма
Лімфоцити, %	38	19-37
Т-лімфоцити, %	60	45-65
CD4, %	49	20-40
CD8, %	11	10-17
ІРІ	4,5	2,5-3
CD22, %	18	15-30
Нульові лімфоцити, %	22	20-25
ЦІК, од екст	110	80-100

Як видно з таблиці 1, у хворого виявляється помірний лімфоцитоз, різке збільшення ІРІ за рахунок підвищення CD4, при нормальному вмісті CD8, CD22, нульових лімфоцитів.

Дослідження імунологічних показників у непрямій реакції поверхневої імуофлюоресценції з використанням мишачих моноклональних антитіл до антигенів лімфоцитів CD3, CD4, CD8, CD22, CD25, CD16 для визначення їх субпопуляційного складу, а також ЦІК методом преципітації з 3,5% розчином поліетилентіколя і функціонального стану нейтрофілів з підрахунком фагоцитарного індексу, фагоцитарного числа і показника завершеності фагоцитозу, дозволило виявити зміни, наведені в таблиці 2.

Таблиця 2

Показник	Показник хворого	Норма
Лімфоцити, %	41	21-39
CD3, %	64	67-76
CD4, %	33	38-46
CD8, %	31	31-40
ІРІ	1,1	1,0-1,5
CD25, %	26	16-20
CD22, %	13	11-16
Нульові лімфоцити, %	24	19-25
CD16, %	8	10-19
ЦЖ, од екстин	0,115	0,006-0,110
Фагоцитарний індекс, %	42	40-80
Фагоцитарне число, ум од	1	4-6
Показник завершеності фагоцитозу, %	16	>20

Аналізуючи наведені дані в таблиці 2, видно, що в хворого відзначається помірний лімфоцитоз,

зниження CD3, CD4, CD 16, а також достовірне зниження фагоцитарної активності нейтрофілів зі зменшенням фагоцитарного числа і показника завершеності фагоцитозу, що ж стосується CD25 і ЦІК, той їхній зміст виявився збільшеним, у той час як ІРІ та CD22 відповідають нормі.

Приклад 2. Хвора А, 1961 р.н., історія хвороби №465, перебувала на стаціонарному лікуванні в інфекційному відділенні 7-ї міської лікарні м. Сімферополя з 31.03.01 по 15.05.01 з діагнозом хронічний гепатит С, стадія загострення, жовтянична форма, середньотяжкий перебіг. При надходженні в стаціонар пред'являла скарги на слабкість, зниження апетиту, підвищення температури тіла до субфебрильних цифр, нудоту, триразову блювоту, вагу в правому підреб'ї, жовтяничне забарвлення шкіри і склер, темний колір сечі. Об'єктивно склери іктеричні, шкіра субіктерична, розміри печінки по Курлову 12/1 х 9 х 7, щільної консистенції, помірно болюча при пальпації. Загальний білірубін 37,4мкмоль/л, прямий - 22,5мкмоль/л, АлАТ - 7,4ммоль/гхл. Діагноз підтверджений виявленням специфічних антитіл до вірусу гепатиту С анти-HCV Ig G 1,64, при нормі до 0,35, і анти-HCV Ig M 0,72, при нормі до 0,35. При дослідженні імунологічних показників методом розеткоутворення були отримані дані, представлені в таблиці 3.

Таблиця 3

Показник	Показник хворого	Норма
Лімфоцити, %	39	19-37
Т-лімфоцити, %	41	45-65
CD4, %	22	20-40
CD8, %	19	10-17
ІРІ	1,2	2,5-3
CD22, %	18	15-30
Нульові лімфоцити, %	22	20-25
ЦІК, од екст	115	80-100

Як видно з таблиці 3, у хворого має місце помірний лімфоцитоз, збільшення ЦІК, зниження Т-лімфоцитів, імунорегуляторний індекс також знижений, хоча зміст CD4, CD8 не виходить за межі норми. Рівень CD22 і нульових лімфоцитів не порушений.

Дослідження імунологічних показників у непрямій реакції поверхневої імуофлюоресценції з використанням мишачих моноклональних антитіл до антигенів лімфоцитів CD3, CD4, CD8, CD22, CD25, CD16 для визначення їх субпопуляційного складу, а також ЦІК методом преципітації з 3,5% розчином поліетилентіколя і функціонального стану нейтрофілів з підрахунком фагоцитарного індексу, фагоцитарного числа і показника завершеності фагоцитозу, дозволило виявити зміни, наведені в таблиці 4.

Таблиця 4

Показник	Показник хворого	Норма
Лімфоцити, %	42	21-39

CD3, %	76	67-76
CD4, %	43	38-46
CD8, %	33	31-40
IP1	1,3	1,0-1,5
CD25, %	18	16-20
CD22, %	11	11-16
Нульові лімфоцити, %	4	19-25
CD16, %	9	10-19
ЦЖ, од екстин	0,125	0,006-0,110
Фагоцитарний індекс, %	58	40-80
Фагоцитарне число, ум од	2	4-6
Показник завершеності фагоцитозу, %	17	>20

Дані таблиці 4 вказують нам на наявність у хворий помірного лімфоцитоза, збільшення ЦЖ, пригнічення неспецифічного захисту, що виявляється зниженням рівня CD16, фагоцитарного числа і показника завершеності фагоцитозу з вираженим зниженням вмісту нульових лімфоцитів

Інші ж показники CD3, CD4, CD8, IP1, CD22, CD25 - не змінені

Наведені приклади підтверджують важливість дослідження поряд з маркерами гепатиту С імунологічних показників методом непрямої реакції поверхневої імуофлюоресценції з використанням мишачих моноклональних антитіл до антигенів лімфоцитів CD3, CD4, CD8, CD16, CD22, CD25, а також рівня циркулюючих імунних комплексів методом преципітації 3,5% розчином поліетиленгліколя і функціонального стану нейтрофілів шляхом підрахунку фагоцитарного індексу, фагоцитарного числа і показника завершеності фагоцитозу, про що свідчить більш точне виявлення вираженості імунологічних порушень

Спосіб дозволяє удосконалити діагностику імунологічних порушень при хронічному гепатиті С шляхом визначення поряд зі специфічними антитільними маркерами вірусу гепатиту С додаткових імунологічних показників, що дозволяє орієнтуватися в глибині імунодефіциту, прогнозувати перебіг захворювання і контролювати ефективність лікування

ДП «Український інститут промислової власності» (Укрпатент)

вул. Сим'ї Хохлових, 15, м. Київ, 04119, Україна

(044) 456 – 20 – 90

ТОВ "Міжнародний науковий компет"

вул. Артема, 77, м. Київ, 04050, Україна

(044) 216 – 32 – 71