



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **87209** (13) **U**
(51) МПК (2013.01)
A61B 10/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2013 10376	(72) Винахідник(и): Виговська Оксана Валентинівна (UA), Крамарьов Сергій Олександрович (UA), Янковський Дмитро Станиславович (UA), Димент Галина Семенівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 23.08.2013	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 27.01.2014	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 27.01.2014, Бюл.№ 2	(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ, бул. Шевченка, 13, м. Київ-4, 01601 (UA)

(54) СПОСІБ КОРЕКЦІЇ ІМУНОЛОГІЧНИХ ПОРУШЕНЬ ПРИ ІНФЕКЦІЙНОМУ МОНОНУКЛЕОЗІ ЕПШТЕЙНА-БАРР ВІРУСНОЇ ЕТІОЛОГІЇ У ДІТЕЙ

(57) Реферат:

Спосіб корекції імунологічних порушень при інфекційному мононуклеозі Епштейна-Барр вірусної етіології у дітей передбачає застосування лікарських засобів. Додатково призначають пробіотик Симбітер ацидофільний концентрований по 1 пакетику 1 раз в день зранку після їжі, тривалість курсу лікування становить 1 місяць.

UA 87209 U

Корисна модель, що заявляється, належить до медицини, а саме до педіатрії, і може бути використана для корекції порушень імунітету, які розвиваються при інфекційному мононуклеозі Епштейна-Барр вірусної етіології у дітей.

Епштейна-Барр вірусна інфекція (ЕБВ) є інфекційною хворобою імунної системи з хронічною персистенцією вірусу. ЕБВ має тропізм до різних клітин, але основною мішенню для нього є В-лімфоцити і дендритні клітини, що несуть на собі рецептор CD21 (або CR2 - рецептор для С3d компонента системи комплементу) [1, 2, 3]. Він може також вражати епітелій слизової носоглотки, ротоглотки, проток слинних залоз, шийки матки, шлунково-кишкового тракту, ендотелій судин, гладких м'язів [4, 5]. Також є повідомлення про можливе інфікування вірусом імунокомпетентних клітин - Т-лімфоцитів (CD3), клітин природних кілерів (NK-клітини-CD16), макрофагів, моноцитів, нейтрофілів [6, 7]. В інфікованому епітелії розвивається літичний цикл розмноження вірусу та клітина гине. Інфіковані В-лімфоцити *in vivo* та *in vitro* набувають здатність до необмеженої проліферації - "безсмертя", лише в невеликій кількості клітин проходить літичний цикл, а в інших клітинах латентний цикл. При ЕБВ інфекції виникають зміни не тільки з боку В-клітинної ланки імунної системи, але і порушення Т-клітинної імунної відповіді й факторів вродженої резистентності (макрофагів, NK-клітин, нейтрофілів), системи інтерферону, цитокінів, системи апоптозу [8, 9]

У гостру фазу ЕБВ інфекції вражається до 20 % всіх циркулюючих в периферичній крові В-лімфоцитів. По мірі одужання кількість ЕБВ-інфікованих ЕБВ (+) В-лімфоцитів зменшується, але через роки після перенесеного інфекційного мононуклеоза (ІМ) однієї із найбільш частих клінічних форм гострої ЕБВ інфекції, вони зберігаються в периферичній крові [9, 10]. Важливою особливістю вірусу є його здатність підвищувати виживаемість ЕБВ (+) В-лімфоцитів за рахунок пригнічення їх загибелі. При відсутності адекватного контролю з боку основних факторів протівірусного імунітету (цитотоксичні лімфоцити (ЦТЛ), NK-клітини, Th1-залежні механізми імунної відповіді) можлива неконтрольована проліферація ЕБВ (+) В-лімфоцитів, клітин, які мають чужорідну генетичну інформацію, що потенційно може призвести до розвитку В-клітинного лімфопроліферативного захворювання, яке проявляється нерідко малігнізацією, особливо у людей із імунодефіцитом) [11, 12, 13]. Як і при інших інфекційних захворюваннях, що викликаються лімфотропними вірусами, наслідки гострої ЕБВ інфекції можуть бути різними і є інтегративним показником взаємодії різних факторів макроорганізму, мікроорганізму і дії суперагентів вірусу.

При ЕБВ інфекції можна спостерігати імунологічний образ, властивий персистуючим вірусним інфекціям в цілому. Різні автори описують різні зміни з боку всіх ланок імунітету при ЕБВ інфекції, дуже часто навіть суперечливі. Так, Niedobitek G. et al., відзначають відсутність достовірних змін рівня В-лімфоцитів із фенотипом CD20+ у дітей із ІМ різного ступеня тяжкості порівняно зі здоровими дітьми та між собою [14]. В інших дослідженнях Kasahara Y., Yachie A., Ohga S. et al. відзначали підвищення концентрації CD21+ В-клітин в перші 3 тижні хвороби у дітей з більш тяжким перебігом ІМ. Про збільшення кількості В-лімфоцитів (з фенотипом CD72+) у ці ж терміни говориться і в інших роботах. У літературі є дані про зниження вмісту в периферичній крові клітин з фенотипом CD 19+ (В-лімфоцити) і CD 19+CD23+ (зрілі В-лімфоцити) в гостру фазу ІМ і в періоді ранньої реконвалесценції, причому ступінь вираженості цього зменшення та його тривалість прямо корелювали з тяжкістю захворювання. Контроль за поширенням ЕБВ в організмі людини, як і при більшості інших вірусних інфекцій, здійснюється спочатку на до-імунному етапі в основному системою інтерферонів і NK-клітинами, а потім - в першу чергу, CD8+ ЦТЛ. Крім цього CD4+ клітини також беруть участь в елімінації ЕБВ. Враховуючи спектр можливої дії вірусу, ЕБВ інфекцію, як і будь-яку лімфотропну інфекцію слід вважати імуносупресивним захворюванням, що приводить до розвитку імунної дисфункції, транзиторного імунодефіциту, вторинної імунної недостатності, із порушеннями клітинного імунітету (вміст і функціональна активність Т- і В-лімфоцитів), гуморального імунітету (концентрація в сироватці крові імуноглобулінів (Ig) А, М, G), факторів природної цитотоксичності (NK-клітини, моноцити /макрофаги, нейтрофіли).

Особливістю ЕБВ інфекції є персистенція вірусу в імунокомпетентних клітинах (ІКК) із збереженням вірусного геному й можливістю хронізації запального процесу. Функціональний стан ІКК найчастіше визначає їх реакцію на вплив або відсутність впливу зовнішніх стимулів, оскільки активовані клітини є більш чутливими до відсутності, так званих, факторів підтримки. При запальному процесі, незалежно від його тривалості, у випадку проникнення в організм збудника і персистування його в клітинах, останній сам виявляється активатором імунної реакції. Суть диференціювання Т- і В-лімфоцитів полягає в експресії антигенпрезентабельних рецепторів і необхідних додаткових сервісних молекул, щоб факт розпізнавання антигену мав дієві наслідки, спрямовані на елімінацію чужорідних антигенів. Експресія на мембрані певних

маркерів диференціювання визначає подальше призначення ІКК в ланцюзі імунних реакцій у відповідь на проникнення ЕБВ і подальший розвиток та наслідки інфекції. При ЕБВ інфекції виникає імунний дисбаланс всіх ланок імунної системи - вміст і функціональну активність Т-і В-лімфоцитів, факторів природної цитотоксичності (NK-клітини, моноцити/макрофаги, нейтрофіли), що вимагає корекції із урахуванням виявлених порушень.

Відомий спосіб корекції імунологічних порушень при інфекційному мононуклеозі ЕБВ етіології, вибраний нами як найближчий аналог, передбачає застосування інозину пронабекс і рекомбінантного інтерферону α -2 β [20]. Інозину пронабекс пригнічує реплікацію ДНК та РНК вірусів, у тому числі ЕБВ шляхом зв'язування із рибосомою ураженої вірусом клітини та зміною її будови. Препарат підвищує противірусну активність інтерферону, зрілих Т-лімфоцитів та кілерів, впливає на В-лімфоцити, підвищуючи синтез антитіл. Препарат має імунокоригуючу активність - моделює імунну відповідь по клітинному типу, стимулює продукцію антитіл, цитокінів, інтерферонів, підвищує функціональну активність макрофагів, нейтрофілів та NK-клітин, захищає уражені клітини від післявірусного зниження синтезу білка. Інозин пронабекс призначався по 50-100 мг/кг/доб перорально в 3-4 прийоми. Проводили 3 курси лікування по 10 днів із інтервалом в 10 днів. Рекомбінантний інтерферон α -2 β пригнічує реплікацію вірусів за рахунок активації ендонуклеази, руйнування вірусної матричної РНК. Препарат модулює імунну відповідь, сприяє диференціації В-лімфоцитів, стимулює продукцію цитокінів, підвищує функціональну активність макрофагів, нейтрофілів та NK-клітин. Природні антиоксиданти, які входять до його складу (вітамін Е та С) стабілізують клітинні мембрани. Рекомбінантний інтерферон α -2 β призначався по пролонгованій схемі запропонованій В.В. Малиновською із співавторами. Ефективність терапії гострої ЕБВ інфекції проведена в двох групах хворих. Пацієнти першої групи (52 дитини) отримували інозин пронабекс в поєднанні із рекомбінантним інтерфероном α -2 β , хворі другої групи (57 дітей) - монотерапію рекомбінантним інтерфероном α -2 β . У пацієнтів обох груп в динаміці реєструвалося достовірне зменшення таких симптомів, як генералізована лімфаденопатія, тонзиліт, аденоїдит, гепатомегалія, спленомегалія. На фоні комбінованої терапії спостерігалось більш швидке зникнення серологічних маркерів реплікації. Комбінована терапія сприяла модуляції імунної відповіді за клітинним типом: збільшення CD3, CD4, CD8, CD16 - та HLA-DRT-лімфоцитів. Зменшувалася готовність ІКК до апоптозу (CD 95). Відмічалася стимуляція вироблення IgA, переключення синтезу антитіл із IgM на IgG, зменшення вмісту ЦІК, покращувалися показники метаболізму нейтрофілів.

Проте цей спосіб має суттєві недоліки:

повної клінічної ефективності досягнуто не було,
не враховувалося, чи захворювання перебігало у вигляді моноінфекції, чи мало місце інфікування іншими герпесвірусами,
не реєструвалася динаміка гематологічних показників,
не реєструвалися рецидиви захворювання впродовж терміну спостереження,
серологічні маркери активності ЕБВ інфекції досліджувалися лише до початку лікування та через 3 місяці терапії,
не відмічалася повного відновлення імунологічних параметрів впродовж терміну дослідження,
не встановлено, чи реплікація ЕБВ зменшувалася на тривалий час. Чи лише на термін дослідження.

В основу корисної моделі, що заявляється, поставлена задача створення такого способу лікування, який би дозволив скоригувати імунологічні порушення повністю, скоротити термін лікування, попереджувати виникнення затяжного і рецидивуючого перебігу захворювання, досягнути тривалого та стійкого зниження вірусної активності.

Технічний результат, що досягається, полягає в зменшенні імунологічних порушень та покращенні ефективності лікування шляхом включення до базисної терапії пробіотику Симбітер.

Поставлена задача вирішується тим, що у відомому способі, який передбачає застосування лікарських засобів, згідно з корисною моделлю, додатково призначають пробіотик Симбітер ацидофільний концентрований по 1 пакетику 1 раз в день зранку після їжі, тривалість курсу лікування становить 1 місяць.

Пробіотики здійснюють імуномодулюючий ефект шляхом посилення фагоцитарної активності макрофагів, моноцитів, гранулоцитів; стимуляції проліферації плазматичних клітин; збільшення синтезу секреторного IgA; стимуляції синтезу лізоциму, коліцину; індукції синтезу інтерферонів, цитокінів, імуноглобулінів, комплементу, пропердину, лізоциму; активації лімфопроліферативної відповіді Т- і В-лімфоцитів; впливу на диференціювання Т-супресорів в пейєрових бляшках; підтримки ІКК людини в стані праймування, стимуляції антитілоутворюючої функції В-лімфоцитів; активації клітинної ланки імунітету, фагоцитарної активності нейтрофілів і

гуморального імунітету; здатності до перехоплення і виведенню вірусів, завдяки феномену молекулярної мімікрії і наявності рецепторів, набутих від епітелію мікроорганізму; підтримці ІКК в стані субактивації [21, 22, 23, 24].

Спосіб здійснюється наступним чином:

В дослідження було включено 185 дітей, хворих на інфекційний мононуклеоз ЕБВ етіології у віці 6-18 років, які перебували на стаціонарному лікуванні в КМДКІЛ з 2006 року по 2012 роки. Діагноз встановлювали на основі клінічних ознак захворювання, лабораторних даних на присутність циркулюючих АТ і корпускулярних Аг, імунофлюоресцентного дослідження. Групу порівняння склали 15 практично здорових дітей віком від 6 до 18 років, які були обстежені у відповідності з міжнародним етичним протоколом.

Дослідження експресії маркерів диференційовки CD включало вивчення експресії антигенів: CD3+ (Т-лімфоцити), CD4+ (Т-хелпери), CD8+ (цитотоксичні Т лімфоцити), CD7+ (Т-лімфоцити, Fc μ R-маркер), CD 16+ (природні кілери або NK-клітини), CD20+ (В-лімфоцити), CD22+ (В-лімфоцити), CD25+ (IL-2R) (Т-лімфоцити, що експресують на своїй поверхні рецептор до інтерлейкіну-2 (IL-2), CD45RA+ (зрілі не імунні або "наївні" лімфоцити), CD95+ (Fas/Apo, маркер апоптозу). Стан Т- і В-клітинного імунітету визначали в гострому періоді хвороби.

Методика дослідження: об'єктом дослідження ІКК, які виділяли з венозної крові, стабілізованої ЕДТА (50 ммоль/5мл), в градієнті фікол - верографін (1,077 "Pharmacia"). Між кожним етапом дослідження ІКК триразово промивали розчином PBS (pH 7,2; "Flow Labs", Великобританія). Потім фіксували на предметних скельцях по 50 мкл/лунку в парах нейтрального формаліну з розрахунку 1-2млн/мл, фарбували моноклональними антитілами, міченими ФІТЦ або PE, PERCP, Cy5, ядра ІКК фарбували Hoechst або Propidium iodide (PI). Результати враховували за допомогою люмінесцентного мікроскопу (Carl Zeiss-250SF), використовували комп'ютерну програму Multichannel AxioVision. Використовували конфокальний лазерний скануючий мікроскоп Axioskop-2 LSM 510 PASCAL Carl ZEISS із гелій-неоновим і аргонним лазерами (Lazer 405/488/543/633 nm, фільтри BP 505-530, LP 650, BP 420-480). Об'єктив-100/1, 4 160/017, окуляр 10 (23), масляна імерсія. Отримані зображення сканували і обробляли за допомогою комп'ютерної програми LSV510. Визначали маркери диференційовки ІКК за допомогою АТ, кон'югованих із флуоресцентними мітками різного спектру світіння при Em-max (FITC/519- зелений, PE/578-жовтий, Cy5/667- червоний, PerCP/678- червоний).

Статистичну обробку результатів проводили методами описової статистики.

При імунологічному обстеженні дітей з ЕБВ інфекцією виявлено зміни Т- і В-клітинної ланки імунітету. Стан Т-клітинної ланки імунітету характеризувався у дітей з гострим перебігом ЕБВ інфекції значним дисбалансом, ознаками активації противірусних механізмів захисту і ознаками порушення регуляції імунної системи. Достовірно, порівняно із групою порівняння, підвищений загальний рівень лімфоцитів за рахунок відносного і абсолютного збільшення вмісту Т- і В-лімфоцитів. Підвищений рівень експресії CD3+ клітин (Т-лімфоцити) відзначається в першу чергу за рахунок збільшення експресії маркеру CD95+ (Fas-ліганда), CD45RA+ ("наївних" лімфоцитів), CD25+ (IL-2R), CD4+ клітин (Т- хелперів) й CD7+ Т-лімфоцитів (Fc μ R-маркера) ($p < 0,05$). З боку експресії маркерів клітин, що вносять основний внесок у противірусний захист організму від ЕБВ - CD8+ клітин (ЦТЛ) та CD 16+ клітин (NK-клітини) має місце наступна ситуація - рівень експресії CD 16+ клітин підвищений ($p < 0,01$), а рівень експресії CD8+ ЦТЛ знижений ($p < 0,05$). Показники В-клітинного імунітету при гострій ЕБВ інфекції також змінюються і характеризуються підвищенням рівня експресії маркерів В-лімфоцитів - CD20+ і CD22+ ($p < 0,05$). Ми провели оцінку впливу розробленої схеми терапії у дітей з включенням пробіотику на імунологічні показники за допомогою методу однофакторного дисперсійного аналізу і отримали наступні дані: через 1 місяць від початку терапії у дітей з гострою ЕБВ інфекцією відзначали, що рівень експресії CD4 + Т-лімфоцитів-хелперів, CD8+ Т-лімфоцитів (ЦТЛ), CD7+ Т-лімфоцитів (Fc μ R-маркера), маркерів активованих лімфоцитів - CD25+ (IL-2R), CD45RA+ та CD95 + (Fas-ліганд, маркер апоптозу) наблизився до показників у дітей із групи порівняння ($p > 0,05$). Рівень експресії маркерів диференційовки інших ІКК-CD3+ лімфоцитів, CD 16+ клітин (NK клітин, природних кілерів), CD20+ В-лімфоцитів і CD22+ В-лімфоцитів залишався підвищеним в порівнянні з групою порівняння ($p < 0,05$). У динаміці захворювання на фоні проведеної терапії із включенням пробіотику у наших пацієнтів реєстрували наступні зміни: рівень експресії маркеру CD3+ лімфоцитів, що відображає загальну кількість Т- і В-лімфоцитів зберігався підвищеним і склав $1,58 \pm 0,08$ г/л в рівнянні з цим показником при надходженні ($1,53 \pm 0,05$ г/л) ($p > 0,05$). Рівень експресії маркерів основних клітин, що беруть участь у противірусному захисті CD4+ Т-лімфоцитів-хелперів, CD7+ Т-лімфоцитів (Fc μ R-Маркер) знижувався в 2 рази відповідно в порівнянні з цими ж показниками при надходженні ($p < 0,05$). Рівень експресії цитотоксичних Т-лімфоцитів (ЦТЛ) - CD8+ Т-лімфоцитів в динаміці, на фоні

терапії підвищився і досяг показника $0,68 \pm 0,06$ г/л у порівнянні з його рівнем при надходженні ($0,43 \pm 0,03$ г/л) ($p < 0,05$). Рівень експресії маркерів В-лімфоцитів - CD20+ і CD22+ В-лімфоцитів на фоні проведеної терапії знизився в 2 рази відповідно до рівню при госпіталізації ($p < 0,05$).

Включення пробіотику Симбітер ацидофільний концентрований до комплексної терапії інфекційного мононуклеозу Епштейна-Барр вірусної етіології у дітей значно зменшує кількість імунологічних порушень, що дозволяє покращити ефективність лікування. Спосіб, що заявляється, може застосовуватись в педіатричній практиці.

Спосіб був апробований на базі кафедри дитячих інфекційних хвороб Національного медичного університету імені О.О. Богомольця. Отриманий позитивний результат дозволяє рекомендувати його для широкого впровадження в клінічну медицину.

Джерела інформації:

1. Cohen J.I. Epstein-Barr virus infection //N.Engl. J. Med. - 2000. - 343: 481-92.
2. Блохина Е.Б. Роль латентной инфекции, вызванной вирусом Эпштейна-Барр, в развитии лимфопролиферативных заболеваний //Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. - 2003. - Т. 2. - № 3. - С. 65-70.
3. Кудин А.П. Эта "безобидная" вирус Эпштейна - Барра инфекция. Часть 1. Характеристика возбудителя. Реакция иммунной системы на вирус // Медицинские новости - 2006. - № 7. - С. 14-22.
4. Ohga S., Nomura A., Takada H. Immunological aspects of Epstein-Barr virus infection //Crit Rev Oncol Hematol. 2002. - Vol. 44, № 3. - P. 203-215.
5. Ikuta K., Satoh Y., Hoshikawa Y. et al. Detection of Epstein-Barr virus in salivas and throat washings in healthy adults and children // Microbes Infect. - 2000. - Vol. 2, № 2. - P. 115-120.
6. Precopio M.L. et al. Differential kinetics and specificity of EBV-specific CD4+and CD8+T cells during primary infection //J. Immunol. 2003. - Vol. 170, №5. - P. 2590-2598.
7. Mittrucker H.W., Kaufmann S.H. Mini-review: regulatory T cells and infection: suppression revisited//Eur. J. Immunol. 2004; 34: 306-312.
8. Кудин А.П., Т.Р. Романовская, М.В. Белевцев Состояние специфического иммунитета при инфекционном мононуклеозе у детей //Медицинский журнал. - 2007. - №1. - С. 102-106.
9. Железникова Г.Ф., Васекина Л.И., Мочакова П.Е. и др. Апоптоз и иммунный ответ у детей с острым инфекционным мононуклеозом // Иммунопатология. Аллергология. Инфектология. - 2000. - № 4. - С. 87-94.
10. Кельцев В.А., Гребенкина Л.И., Петрова Е.В. и др. Функциональное состояние и взаимосвязь иммунной и эндокринной систем у больных Эпштейна-Барра вирусным мононуклеозом //Детские инфекции.-2005. -№ 1. - С. 29-32.
11. Cohen J.DL, Kimura H., Nakamura S., Ko Y.H., Jaffe E.DS. Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disease in non-immunocompromised hosts: a status report and summary of an international meeting, 8-9 September 2008 //Ann Oncol. 2009 September; 20 (9): 1472-1482.
12. Kawa K. Epstein-Barr virus-associated diseases in humans //Inf. J. Hematol.-2000.-Vol. 71.-P. 108-117.
13. Kasahara Y., Yachie A. Cell type specific infection of Epstein-Barr virus (EBV) in EBV-associated hemophagocytie lymphohistiocytosis and chronic active EBV infection //Crit Rev Oncol Hematol. 2002. Vol. 44, №3. - P. 283-294.
14. Niedobitek G., Agathangelou A., Herbst H. et al. Epstein-Barr vims (EBV) infection in infectious mononucleosis: vims latency, replication and phenotype of EBV-infected cells //J Pathol. 1997. Vol. 182, № 2. - P.151-159.
15. Симованьян Э.Н., Денисенко В.Б., Бовтало Л.Ф., Григорян А.В. Эпштейна-Барра вирусная инфекция у детей: современные подходы к диагностике и лечению //Печаший врач. - 2007. - №7. - С. 36-41.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб корекції імунологічних порушень при інфекційному мононуклеозі Епштейна-Барр вірусної етіології у дітей, що передбачає застосування лікарських засобів, який **відрізняється** тим, що додатково призначають пробіотик Симбітер ацидофільний концентрований по 1 пакету 1 раз в день зранку після їжі, тривалість курсу лікування становить 1 місяць.

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601