

**Министерство Высшего и Среднего Специального
Образования Республики Узбекистан**

**Ташкентский Государственный Технический Университет
им. А.Р. Беруний**

УДК-616. 36-002. 2-071-053. 2

Тураходжаева Нигора Мухаматовна

**Характеристика и прогноз хронического вирусного гепатита С в
зависимости от генотипа вируса**

**Диссертация написана для получения академической
степени магистра**

**Научный руководитель:
Доцент Таджиев Б.М.**

Ташкент-2010 год.

О Г Л А В Л Е Н И Е

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	3
ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	8
1.1. Наши задачи и цель в год гармоничного развития население.....	8
1.2. Проблема ХВГВ у детей на современном этапе.....	11
1.3. Географическое распределение генотипов вируса гепатита В.....	26
1.4. Методы современной диагностики хронического гепатита В.....	34
ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	39
2.1. Общая характеристика больных	39
2.2. Методы исследования	43
ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ.....	47
3.1. Клинико-лабораторные показатели детей с Д-генотипом HBV.....	49
3.2. Клинико-лабораторные показатели детей с А-генотипом HBV.....	55
3.3. Клинико-лабораторные показатели детей с С-генотипом HBV.....	57
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	63
ВЫВОДЫ.....	68
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	69
СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ.....	70
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	71

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АлАТ – аланинаминотрансфераза

АсАТ – аспартатаминотрансфераза

Анти-НВV- антитела к вирусу гепатита В

Анти-НСV- антитела к вирусу гепатита С

ГЦК – гепатоцеллюлярная карцинома

Branched DNA – амплификации сигнала

ДЖВП – дискинезия желчевыводящих путей

ИГА- индекс гистологического активности

ИФА – иммуноферментный анализ

ИФН- интерферон

МЕ –международный единица

Ммоль/л –миллимоль на литр

Мкмоль/л –микромоль на литр

НВsAg - поверхностный компонент антигена вирусного гепатита В

НВsAb - антитела к поверхностному антигену вирусного гепатита В

НВеAg - антиген инфекционности вирусного гепатита В

НВеAb - антитела к антигену инфекционности вирусного гепатита В

НВсorAb - антитела к ядерному компоненту антигена вируса гепатита В

НВV-DNA - геном вируса гепатита В

HLA – человеческий лейкоцитарный антиген

МКБ – международная классификация болезней

ОВГВ- острый вирусный гепатит В

ОВГС- острый вирусный гепатит С

ПЦР - полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

РНК - HDV - геном вируса гепатита дельта

РБВ - рибавирин

ХВГ – хронический вирусный гепатит

ХВМГ- хронический вирусный микст гепатит

ХВГВ – хронический вирусный гепатит В

ЦП –цирроз печени

ЩФ - щелочная фосфатаза

Ig M – иммуноглобулин М

Ig G – иммуноглобулин G

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Хронический вирусный гепатит В продолжает оставаться важной проблемой здравоохранения во всем мире [1, 11, 21, 24, 37, 57].

По своей медицинской значимости и величине социально-экономического ущерба ХВГВ занимает ведущее место в инфекционной патологии. Ежегодная частота возникновения новых случаев ВГВ в Европе составляет 0,9-1 миллион инфицированных лиц. В Германии ежегодно регистрируется 35 новых случаев инфекционного гепатита на 100 тыс. населения, при этом 40% приходится на ВГВ [41]. В странах СНГ в целом ежегодно регистрировалось около 100 тыс. случаев ОГВ [33, 40, 52]. В г. Ташкенте уровень заболеваемости ВГВ превысил среднереспубликанские значения в 2000г. в 4 раза, в 2001г. – в 4,8 раза, в 2002г. – в 3,8 раза. Неблагополучная эпидемическая ситуация сохраняется в Бухарской, Навоинской, Сурхандарьинской областях.

ХВГВ является причиной развития таких тяжелых осложнений, как цирроз печени, гепатоцеллюлярная карцинома, ведущих к потере трудоспособности, инвалидизации и летальным исходам. Во всем мире число летальных исходов у больных с различными формами ОГВ и ХВГВ достигает 250 тыс. в год [83]. Широкий диапазон репликативной активности ВГВ свидетельствует о его генетической неоднородности.

В настоящее время описаны 9 генотипов HBV: А, В, С, D, Е, F, G, H и w4В [38, 45, 74], имеющих характерное географическое распределение [35, 43].

Одним из факторов, способствующих повсеместному сохранению ВГВ, является способность вируса ГВ существовать в нескольких биологических вариантах, называемых мутантными формами. Высокая частота мутации ВГВ обусловлена особенностью репликации данного вируса с использованием механизма обратной транскрипции. Мутанты играют важнейшую роль в истории существования ГВ и есть основания полагать, что генетические

вариации поддерживают HBV инфекцию [50]. Мутанты не до конца еще понятным способом связаны с эволюционным переходом к хронической форме заболевания и, возможно, имеют немаловажное значение в гепатокарциногенезе, развитии фульминантного гепатита и асимтоматическом течении HBV инфекции. На диагностическом уровне становится все более очевидно, что мутации HBV генома могут приводить к развитию инфекции с атипичной серологией, не укладывающейся в обычную трактовку результатов, оказывать влияние на клиническое течение, исходы HBV-инфекции [30].

В Республике Узбекистан исследования по географическому распространению мутантов не проводились, не изучались спектр и выраженность клинических проявлений, особенности серологического профиля, исходы заболевания, вызванного мутантным штаммом вируса.

Большинством исследователей признается основополагающая роль системы ИФН в ответе макроорганизма на HBV-инфекцию, а также клеточного ответа на ИФН, который может быть изменен терминальным протеином вируса, входящим в структуру HBV. Однако сообщений о состоянии системы ИФН детей, инфицированных различными генотипами HBV, в анализируемой литературе мы не встретили. Недостаточно данных о роли показателей интерферогенеза при оценке эффективности противовирусного лечения ВГВ.

Последние достижения молекулярной биологии выявили высокую способность генома HBV к мутациям, которые определяют латентный характер вирусной инфекции, низкий уровень репликации, более активное поражение печени у ряда больных с наличием мутаций в pre-core- области и нарушения клеточного и гуморального иммунитета организма-хозяина [19, 26, 31].

Изучение генотипов современном этапе является актуальным. На основании изучения генотипов можно будет судить не только о этиологическом фактора но и изучить влияние генотипа на течение и прогноз заболевание.

Все вышесказанное свидетельствует об актуальности данной проблемы и предопределяет цель и задачи настоящей работы.

Цель исследования:

Изучить особенности клинико-лабораторных показателей ХВГВ у детей с различными генотипами HBV в Узбекистане.

Задачи исследования:

1. Определить частоту встречаемости генотипов HBV среди детей с хроническим вирусным гепатитом В.
2. Установить клинико-лабораторные особенности хронического вирусного гепатита В у детей с различными генотипами HBV.

Научная новизна:

1. Впервые в Республике выявлена частота встречаемости генотипов HBV у детей с хроническим вирусным гепатитом В. Преобладающим среди них является D-генотип в сравнении с A и C генотипами HBV.
2. Выявлены клинико-биохимические особенности хронического гепатита В у детей с различными генотипами HBV.
3. Установлено, что тяжелее заболевание протекает у детей с C-генотипом: они чаще жаловались на слабость, утомляемость, плохой аппетит, у них была более выражена гепатомегалия, спленомегалия, чаще встречались внепеченочные знаки, выше были показатели АлАТ и АсАТ.

Практическая значимость:

- Выявлены клинико-биохимические особенности хронического гепатита В в зависимости от генотипа HBV циркулирующих в Узбекистане.

Структура и объем диссертации: Диссертационная работа выполнена на русском языке. Диссертация состоит из списка условных обозначений, обзора литературы, материалов и методов исследований, результаты собственного исследования и их обсуждения, заключения, выводы, практические рекомендации и списка литературы.

Диссертация изложена на 79 компьютерных страницах, иллюстрирована 7 таблицами и 4 диаграммами.

Список использованной литературы включает 87 источников, из них 48 русских и узбекских, а также 39 зарубежных источников.

ГЛАВА I.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.

1.1. Наши задачи и цель в год гармоничного развития население.

Президент Республике Узбекистан И.А. Каримов объявил 2010 год «Годом гармоничного развития население».

Он в своем докладе сказал: Мы ставим перед собой цель-создать необходимые возможности и условия для того, чтобы наши дети росли не только физически и духовно здоровыми, но и всесторонне и гармонично развитыми людьми, обладающими самыми современными интеллектуальными знаниями, людьми, в полной мере отвечающими требованиям XXI века, в котором им предстоит жить и трудиться.

Недавно принятая правительством Государственная программа по этому вопросу предусматривает мобилизацию имеющихся у нас ресурсов и возможностей, имея в виду все и государственные и негосударственные источники для реализации поставленной цели.

На выполнение предусмотренного в программе комплекса мер намечено направить в 2010 году за счет всех источников финансирования около 8 триллионов сумов, в том числе 1,8 триллиона сумов-это средства государства, 3,3 триллиона-кредиты коммерческих банков и более 2,7 триллиона сумов- собственные средства ответственных исполнителей.

Думаю, что выражу общее наше мнение, мнение людей, живущих на благословенной земле Узбекистана, если скажу-реализация этой программы-это дело всех и каждого из нас. Главное-подойти к ее выполнению не формально, а с душой, с пониманием того, что через эту программу мы строим великое будущее своей страны [22, 23].

Кроме этого 29 августа 1996 году принято закон Республики Узбекистан «Об охране здоровье граждан», в нём даются основные задачи законодательство об охране здоровья граждан [24, 25].

Основными задачами законодательства об охране здоровья граждан являются обеспечение гарантий прав граждан на охрану здоровья со

стороны государства, формировании здорового образа жизни граждан, правовое регулирование деятельности государственных органов, предприятий, учреждений, организаций, общественных объединений в области охраны здоровья граждан.

Основными принципами охраны здоровья граждан являются соблюдение прав человека в области охраны здоровья, доступность медицинской помощи для всех слоев населения. Приоритет профилактических мер, социальная защищенность граждан в случае утраты здоровья, единство медицинской науки и практики.

Граждане Республики Узбекистан обладают неотъемлемым правом на здоровье, государство обеспечивает гражданам охрану здоровья независимо от возраста, пола, расы, национальности, языка, отношения к религии, социального происхождения, убеждений, личного и общественного положения, государство гарантирует гражданам защиту от дискриминации независимо от наличия у них любых форм заболеваний. Лица, виновные в нарушении этого положения, несут ответственность в порядке, установленном законом.

Права несовершеннолетних на охрану здоровья обеспечиваются государством созданием наиболее благоприятных условий для их физического, духовного развития, профилактики заболеваний, а также организацией медицинского обслуживания в дошкольных, школьных и иных учреждениях, несовершеннолетние имеют право на диспансерное наблюдение и лечение, в детских и подростковых лечебно – профилактических учреждениях в порядке, устанавливаемом Министерством здравоохранения, санитарно – гигиеническое образование, обучение и труд в условиях, отвечающих их физиологическим особенностям и состоянию здоровья, бесплатную медицинскую консультацию за счет бюджетных средств при определении профессиональной пригодности, получение необходимой информации о состоянии здоровья в доступной для них форме, несовершеннолетние в

возрасте старше пятнадцати лет имеют право на добровольное информированное согласие на медицинское вмешательство или отказ от него, несовершеннолетние с недостатками физического или психического развития по заявлению родителей или лиц, их заменяющих, могут содержаться в учреждениях системы социальной защиты за счет бюджетных средств, благотворительных и иных фондов, а также за счет средств родителей или лиц, их заменяющих, нарушения прав и интересов несовершеннолетних родителями или другими лицами, на попечения которых они находятся, уклонение от воспитания, жестокое обращение, наносящее вред здоровью несовершеннолетних, влекут ответственность в порядке, установленном законом.

Кабинет Министров Республики Узбекистан осуществляет защиту прав человека в области охраны здоровья, государственную политику в области охраны здоровья граждан, утверждение и финансирование программ по развитию здравоохранения и медицинской науки управление государственной системой здравоохранения, контроль за обеспечением санитарно–эпидемиологического благополучия, реализация мер, направленных на спасение жизни людей и защиту их здоровья при чрезвычайных ситуациях, информирование граждан об обстановке в зоне чрезвычайной ситуации и принимаемых мерах, установление единой системы статистического учета и отчетности в области охраны здоровья граждан, утверждение базовых программ медицинского страхования граждан Республики Узбекистан, определение льгот отдельным группам граждан в оказании медицинской помощи и лекарственном обеспечении, координацию и контроль деятельности органов государственного управления, хозяйствующих субъектов в области охраны здоровья граждан, охраны семьи, материнства и детства, другие полномочия в соответствии с законодательства [23].

Гражданам, страдающим заболеваниями, представляющими опасность для окружающих, перечень которых утверждается Кабинетом Министров

Республики Узбекистан, медико-социальная помощь оказывается бесплатно в предназначенных для этой цели учреждениях государственной системы здравоохранения, виды и объем медико-социальной помощи гражданам, страдающим заболеваниями, представляющими опасность для окружающих, устанавливаются Министров Здравоохранения Республики Узбекистан совместно с заинтересованными министерствами и ведомствами.

Те задачи, те приоритеты социально-экономического и медико-социального развития, обоснованны и вполне нам по плечу [24].

1.2. Проблема ХВГВ у детей на современном этапе.

Вирусный гепатит В- остается одной из самых актуальных проблем здравоохранения во всем мире, имея высокую социальную, эпидемиологическую и экономическую значимость [1, 2, 11, 14, 15, 31, 38, 57, 61, 67].

Особенностями ВГВ на современном этапе является неуклонный рост заболеваемости как острыми, так и хроническими формами, изменение структуры, путей передачи, формирование латентной инфекции и связанные с этим, трудности ее диагностики [2, 11, 17, 31, 82].

Разнообразие клинических форм хронической вирусной HBV-инфекции от так называемого носительства до высокоактивного гепатита с быстрым формированием цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы определяется несколькими причинами, среди которых первое место занимает генотипическое разнообразие вируса гепатита В [3, 15, 17].

HBV принадлежит к семейству гепаднавирусов и в отличие от других ДНК – содержащих вирусов, для своей репликации использует фермент обратную транскриптазу и промежуточные формы РНК (перегоном). Подобный механизм репликации, характерный для РНК-содержащих вирусов, связан с повышенной частотой развития мутаций генома. Клинически проявляют себя лишь те штаммы HBV, которые, несмотря на мутацию, сохраняют устойчивость структуры и способность размножаться, а также имеют преимущество перед классическим «диким» вариантом HBV в

плане ухода от иммунного надзора организма. Расшифровка строения генома, мутаций и механизма репликации вируса служит основой для изучения и прогнозирования естественного течения инфекции, разработки эффективных методов диагностики, профилактики и лечения [1].

Внедрение молекулярно-биологических методов диагностики позволило выделить мутантные штаммы HBV, что затрудняет подтверждение вирусной этиологии гепатита при использовании только серологических методов исследования [2, 47, 56].

При использовании высоко специфических методов полимеразной цепной реакции, метода гибридизации *in situ*, а также иммуногистохимических методов на основании идентификации репликативных форм HBV или антигенов вируса (HBeAg, HBcAg) доказана внепеченочная репликация, в том числе лимфотропность, этого вируса [3].

Наиболее часто встречается незаметное или малосимптомное течение заболевания, когда доминируют жалобы астено-вегетативного характера и регистрируется низкая или минимальная активность АлАТ [26, 31].

В то же время ряд авторов указывают на наличие (до 25% случаев) клинически тяжелых вариантов ХВГВ с внепеченочными проявлениями, умеренной или высокой активностью АлАТ и высоким индексом гистологической активности, при которых в сыворотке крови выявляются аутоантитела [1, 3, 13, 39].

Одна из основной проблемой изучения хронических гепатитов, надо была разработать новую полноценную классификацию хронических гепатитов и оно разработано.

Новая классификация хронического гепатита (ХГ) рекомендованная Международным конгрессом гастроэнтерологов (Лос-Анджелес, 1994г.), прогрессивна, поскольку в основу ее положен этиологический фактор, а значит, она способствует утверждению нозологии, которая в наше время переживает кризис [7].

Новая классификация ХГ учитывает три категории оценки : этиологию,

степень активности процесса и стадию заболевания.

Руководствуясь им, эксперты выделяют вирусный, аутоиммунный, лекарственный и криптогенный ХГ. На наш взгляд, перечень этиологических факторов ХГ должен быть расширен.

Во-первых, классификацию следует дополнить алкогольным ХГ, о чем писали ранее и пишут в настоящее время прежде всего патологи (7, 38). Исключение алкоголя из этиологических факторов ХГ нельзя оправдать тем, что вызываемый им хронический воспалительный процесс в печени при прогрессировании "имеет разную морфологическую характеристику" [44].

Необходимость выделения алкогольного ХГ обосновывается, а частности, и тем, что он часто сочетается с вирусным гепатитом С. Правы S. Takase и соавт. [62], считая, что у алкоголиков следует различать три категории ХГ: вызванный только этанолом, только вирусом и сочетанием этанола и вируса.

Во-вторых, в классификацию должен быть включен наследственный ХГ при недостаточности α_1 -антитрипсина и болезни Вильсона-Коновалова. Исключение ХГ из классификации при этих заболеваниях на основании лишь того, что они "имеют внепеченочную манифестацию" [44], не оправдано хотя бы тем, что ХГ вирусной природы также манифестирует за пределами печени [24,38].

В-третьих, в классификации забыли смешанный ХГ, который так част при различных сочетаниях гепатотропных вирусов [24].

Вирусный ХГ может быть вызван вирусом гепатита В (HBV), С (HCV) и D (HDV). Этим трем вирусам свойственны одинаковые пути распространения (через кровь и ее продукты, "сексуальный", семейный и др.) и длительная персистенция в организме, что отличает их от вирусов А и Е, при которых хронизация острого гепатита отсутствует. Очень важно при этих трех разновидностях ХГ знать фазу развития вируса, его репликационную активность, что возможно, используя иммунологические методы и методы молекулярной биологии (полимеразная цепная реакция). Репликационная

активность прежде всего определяет прогрессирование и прогноз заболевания, а значит, и лечебную тактику.

Аутоиммунный ХГ выделен скорее на основании особенностей патогенеза, а не этиологии — ведь факторы, снижающие иммунологическую толерантность к ткани печени и "запускающие" аутоиммунный процесс при этом заболевании, неизвестны. Поэтому диагноз опирается в основном на патогенетические стигмы [44], гипергаммаглобулинемия; наличие антител к ткани печени, микросомам и плазматической мембране гепатоцитов, гладким мышцам, растворимому печеночному и печеночно-панкреатическому антигенам, к сиалопротеиновым рецепторам; отсутствие антимитохондриальных антител; нарушения в системе HLA с преобладанием B8, DR3, DR4; обнаружение других аутоиммунных заболеваний (тиреоидит, язвенный колит, болезнь Шегрена); положительный ответ на иммуносупрессивную терапию.

Таблица-1.2.1

Компоненты индекса гистологической активности (ИГА) при хроническом гепатите по R. G. Knodell

№	Компонент ИГА	Балл
1.	Перипортальные некрозы гепатоцитов, включая Мостовидные	0-10
2.	Внутридольковые фокальные некрозы и дистрофия гепатоцитов	0-4
3.	Воспалительный инфильтрат в портальных Трактах	0-4
4.	Фиброз	0-4

Выделение подгрупп аутоиммунного ХГ эксперты считают спорным.

Лекарственный ХГ может быть связан как с прямым токсическим действием лекарств или их метаболитов, так с идиосинক্রазией к ним, причем идиосинক্রазии может проявляться нарушениями метаболического либо иммунологического характера [44]. Видимо, поэтому лекарственный ХГ может быть подобен вирусному или аутоиммунному с антиядерными и аитимикросомальными антителами [63].

Криптогенный ХГ, по мнению экспертов, "следует считать заболеванием печени с характерными для ХГ морфологическими изменениями при исключении вирусной, аутоиммунной и лекарственной этиологии" [42]. Определение, на наш взгляд, весьма шаткое, поскольку, как уже говорилось, не учитывается возможность алкогольного воздействия, наследственных факторов и поражений комбинированного (смешанного) происхождения.

Итак, предусматриваемые новой классификацией "этиологические формы" ХГ-вирусный, аутоиммунный, лекарственный и криптогенный-должны, на наш взгляд, быть дополнены алкогольным, наследственным и смешанным.

В прежней классификации ХГ, как известно, активность процесса отражала лишь одна форма ХГ-активный (ранее агрессивный) ХГ (ХАГ). для которого характерны выход лимфомакрофагального инфильтрата за пределы портального тракта, разрушение пограничной пластинки с образованием чаще ступенчатых некрозов. Степень активности отражала и величина некрозов паренхимы печени-от ступенчатых до мультилобулярных. Поэтому-то при массивных некрозах печени говорят о быстро прогрессирующем, злокачественном, или фульминантном гепатите.

Л. И Аруин выделяет три степени активности. При 1-й (минимальной) степени перипортальные ступенчатые некрозы ограничены небольшими

сегментами только перипортальной зоны, поражается лишь часть портальных трактов. При 2-й (умеренной) степени активности ступенчатые некрозы также ограничены перипортальными зонами, но в процесс вовлечены почти все портальные тракты. При 3-й (выраженной) степени активности некрозы глубоко проникают в глубь долек, имеются перисептальные сливающиеся мостовидные некрозы.

Антиподом ХАГ считался персистирующий ХГ (ХПГ). Однако одни авторы допускают при ХПГ "наличие небольших ступенчатых некрозов"[61], другие рассматривают их как признаки слабо выраженного ХАГ. К тому же ХАГ в стадии ремиссии может иметь черты ХПГ. Руководствуясь этими данными, Л. И. Аруин предлагает отказаться от термина "ХПГ" и говорить в таких случаях о неактивном гепатите.

Новая классификация ХГ рекомендует клиническому патологу не ограничиваться только качественной характеристикой трех степеней активности (минимальная, умеренная, выраженная), а использовать для этой цели полуколичественный анализ определения индекса гистологической активности (ИГА), известного также как индекс Knodell. ИГА учитывает в баллах следующие морфологические компоненты ХГ (табл. 1.2.1): 1-й-перипортальные некрозы гепатоцитов, включая мостовидные, оценивается от 0 до 10 баллов; 2-й-внутридольковые фокальные некрозы и дистрофия гепатоцитов-от 0 до 4 баллов; 3-й-воспалительный инфильтрат в портальных трактах-от 0 до 4 баллов; 4-й-фиброз-от 0 до 4 баллов. ИГА от 1 до 3 баллов характерен для "минимального" ХГ; при нарастании активности (ИГА 4-8 баллов) можно говорить о "мягком" ХГ. ИГА в 9-12 баллов характерен для "умеренного", а в 13-18 баллов - "тяжелого" ХГ.

Оценивая ИГА Knodell, следует заметить, что воспалительная инфильтрация портальных трактов при ХГ рассматривается как "компонент активности". Из этого следует, что эксперты новой классификации ХГ не считают ХПГ неактивным, по их мнению, это ХГ "с минимальной активно-

стью". Как видно, между схемой определения активности ХГ Л. И. Аруина и R. G. Knodell существует различие.

Это различие еще более усугубляется включением в ИГА Knodell 4-го компонента-фиброза, который не отражает активность процесса, а характеризует его хронизацию. В комментарии к новой классификации ХГ V. J. Desmet в связи с этим предлагают исключить из ИГА 4-й его компонент и пользоваться только 1—3-м. Рекомендую ИГА, включающий лишь первые три компонента, они вместе с тем считают полезным поиск клиническим патологом новых путей полуколичественной оценки степени активности ХГ с использованием статистического анализа.

Новая классификация ХГ умалчивает о проявлениях активности болезни за пределами печени, особенно при вирусном и аутоиммунном гепатите. Внепеченочные (системные) проявления ХГ, отражающие активность болезни, обусловлены как иммунокомплексными реакциями, так и сочетанием их с реакциями гиперчувствительности замедленного типа [7,61].

Они представлены разнообразной клинической патологией, "перекрывающей" порой патологию печени [38,61].

Стадия ХГ, как считают эксперты, отражает временное его течение и характеризуется степенью фиброза печени вплоть до развития ее цирроза. В связи с этим рекомендуют различать портальный, перипортальный и перигепатоцеллюлярный фиброз. При перипортальном фиброзе формируются портоцентральные или порто-портальные септы, при этом первые по сравнению со вторыми являются более важными.

Для полуколичественной оценки степени фиброза предлагаются различные схемы счета (табл. 1.2.2), которые мало отличаются друг от друга в оценках степени фиброза. Цирроз печени рассматривается как необратимая стадия ХГ. К сожалению, критерий активности цирроза не учитывается.

В настоящее время ВГВ – одна из самых распространенных на земном шаре инфекций. В мире насчитывается более 2 млрд. человек, имеющих

маркеры перенесенной HBV-инфекции. Около 400 млн. человек являются хроническими носителями HBV [6, 7, 15, 16].

Таблица-1.2.2

Полуколичественные системы учета степени фиброза печени при определении стадии хронического гепатита по V. J. Desmet

Балл	Степень фиброза	Характер фиброза		
0	Фиброз Отсутствует	Фиброз Отсутствует	Фиброз Отсутствует	Фиброз Отсутствует
1	Слабый	Фиброз расширение портальных трактов	Портальный и перипортальный фиброз	Фиброз расширение портальных трактов
2	Умеренный		Порто- портальный септы (≥ 1)	Перипортальный фиброз, Порто- портальный септы
3	Тяжелый	Порто- портальный и(или) Портоцентральн ые септы	Портоцентральн ые септы (≥ 1)	Фиброз с нарушением строения печени (но не цирроз)
4	Цирроз	Цирроз	Цирроз	Цирроз

Среди причин смертности ХВГВ занимают седьмое место, а по критерию «годы потенциально-потерянной жизни» - стабильно занимают третье место, уступая лишь пневмониям и острым диареям [16, 37, 39, 75, 80, 82]. С HBV-инфекцией связано более 1 млн. смертей в мире ежегодно, включая циррозы печени (около 700 тыс.) и первичный рак печени (300 тыс.) [10, 40, 81, 85].

Распространенность маркеров ВГВ не равномерная и варьирует от 1% до 95% больных. Соответственно выделяют районы с высокой (8-20%), промежуточной (2-7%) и низкой (менее 2%) распространенностью этого заболевания [63, 73].

Ежегодная частота возникновения новых случаев ВГВ в Европе составляет 0,9 – 1 млн. инфицированных лиц [28]. В Германии ежегодно регистрируется 35 свежих случаев инфекционного гепатита на 100 тыс. населения, при этом 40% приходится на ВГВ [41].

В странах СНГ в целом ежегодно регистрировалось около 100 тыс. случаев ОВГВ, а фактическая заболеваемость в них, по крайней мере, вдвое выше [33, 40, 55]. В 2001г. в целом по России было зарегистрировано 23271 новых случаев ХГВ, что на 13 % превысило показатели заболеваемости ХГВ в 2000 г. В Москве уровень заболеваемости этой нозологической формой за период с 1999 по 2001 гг. вырос в 1,4 раза. В возрастном составе заболевших преобладали лица старше 30 лет, их удельный вес составляет 75-90 % [26]. У детей доля ВГВ в структуре всех ОГ постоянно снижается и в настоящее время составляет не более 5-10%, однако в структуре ХГ и поражений печени у соматических больных ВГВ по-прежнему доминирует, составляя около 50% [9, 38, 72]. С 1999 по 2001г. заболеваемость ВГВ осталась практически на одном уровне (в 1999 – 1,88, в 2001 – 1,56 на 100 тыс. детского населения). Удельный вес детей до 14 лет составил от 5,3% до 12 % [19].

Республика Узбекистан является гиперэндемичной территорией в отношении ВГ [1, 2, 14, 15, 16,]. Показатели заболеваемости ВГВ в 2000 г. составили 61,94 на 100 тыс. населения, а в 2001 и 2002 гг. они снизились на 24,2% и 39,2% соответственно. Следует отметить, что показатели в отдельных регионах Республики были не одинаковыми. Сравнительно высокие показатели, превышающие среднереспубликанские уровни, были зарегистрированы в г.Ташкенте, Кашкадарьинской, Сурхандарьинской, Наманганской, Самаркандской областях в 2000-2001 гг. и в г.Ташкенте, Бухарской, Навоийской областях в 2002г.

Среди детей до 14 лет заболеваемость ВГВ в 2000г. составила 79,61 на 100 тыс. населения, в 2001г снизилась на 19%, а в 2002– на 37,9%. В г. Ташкенте уровень заболеваемости ВГВ превысил среднереспубликанские значения в 2000 г в 4 раза, в 2001 г – в 4,8 раза, в 2002г– в 3,8 раза. Неблагополучная эпидситуация сохраняется в Бухарской, Навоийской, Сурхандарьинской областях. Наиболее часто ВГВ регистрируется у детей от 1 года до 3 лет [1, 2, 14].

Одним из факторов, способствующих повсеместному сохранению ВГВ, является способность вируса ГВ существовать в нескольких биологических вариантах, называемых мутантными формами.

В последние годы изучена последовательность нуклеотидов в геноме вирусной частицы и уточнены гены, кодирующие определенные белки вируса. Так, установлено, что ДНК HB-вируса включает в себя 4 гена (S,C,P,X), перекрывающие друг друга [55, 57, 61].

Ген S состоит из трех зон: pre-S1, pre-S2, сообщающий S-гена. Малый (S) или главный HBsAg кодируется S геном и состоит из 226 аминокислот. Средний (M) HBsAg кодируется S геном и pre-S2 областью генома и включает 55 аминокислот. Большой (L) HBsAg кодируется S геном и обеими pre-S1 и pre-S2 областями генома. Мембрана вириона представляет собой смесь S, M и L белков в гликозилированной и негликозилированной формах [9, 13, 35]. Pre-S1 и pre-S2 белки - дополнительные поверхностные антигены, экспрессируемые в гораздо меньшем количестве, чем S протеин [15]. Они содержат структуры, необходимые для прикрепления HBV к гепатоцитам, большое количество T и B-клеточных эпитопов [17].

Ген C (cor) состоит из двух зон: pre-C1 и собственно C-гена, кодирует белок сердцевины и его антигены (HBcAg и HBeAg). HBeAg можно считать побочным продуктом синтеза HBcAg. Это полипептид последнего, приобретающий свою окончательную форму в результате посттрансляционного процесса [10]. HBeAg экспрессируется на поверхности гепатоцитов и, полагают, что он является важнейшей мишенью, на которую

направлены защитные иммунологические реакции, приводящие к разрушению гепатоцитов [48, 51].

Ген Р кодирует фермент ДНК-полимеразу, необходим для достройки внутренней короткой цепи ДНК-ВГВ в процессе ее репликации.

Ген Х ответственен за экспрессию Х-антигена- белка, чьи биологические и патобиологические функции не до конца понятны. Известно, что продукты Х гена обладают регуляторными свойствами и активируют транскрипцию большого количества клеточных промоторов [11, 32, 69].

Вышеизложенная информация имеет важное практическое значение, поскольку в последние годы установлено, что в той или иной зоне генома под действием различных факторов могут происходить точечные мутации.

Точечная мутация возникает как результат замены, добавления или делеции нуклеотидов. Мутации могут приводить к синтезу дефектного, неактивного белка или к потере способности продуцировать ранее синтезируемые белки. Возникновение и/или отбор мутантов отражает попытки вируса противостоять иммунологической атаке хозяина и выжить [26, 57, 61]. Первичные точечные мутации предоставляют существенное преимущество в том случае, если они позволяют вирусу ускользнуть от иммунного ответа хозяина. В результате, антигенная структура вируса становится все запутанней и сложнее. Хозяину становится все труднее «отлавливать» вирус и избавляться от него посредством иммунологических механизмов [75, 80]. Если мутация обеспечивает жизнеспособность вируса, то она закрепляется в его геноме только после того, как подтверждается преимущество мутированного штамма перед диким.

Мутации HBV были описаны неоднократно [16, 48, 53, 55]. HBV гораздо больше подвержен мутагенезу, чем ранее предполагалось, так как во время его репликации происходит обратная транскрипция РНК прегенома, а этот процесс не застрахован от ошибок, так как не предусмотрена возможность проверки считывания [34]. Подобная репликация приводит к замене 2×10^{-4} оснований на сайт в год, то есть на 4 порядка больше, чем у других ДНК

вирусов, но меньше, чем у РНК-содержащих вирусов [57]. Мутанты были идентифицированы у пациентов с острым, фульминантным гепатитом, у больных хронической HBV-инфекцией [26, 34, 38, 47].

Мутации HBV можно сгруппировать следующим образом: мутанты пре-C/C-гена, пре-S/S гена, гена полимеразы/обратной транскриптазы и мутанты X гена.

Наиболее часто наблюдается пре-core мутация (это трансверсия G на A в 1896 нуклеотиде) [19, 49]. Эта замена приводит к нарушению экспрессии пре-C/C протеина, который функционирует как предшественник HBeAg [63, 67, 72, 73, 77, 81, 85]. Менее распространенные пре-core мутации: мутации иницирующего кодона (в позициях 1814 или 1815), nonsense мутации в положении 1874, missense мутации в положении 1862 и сдвиги ORC [38]. Core ген содержит и гуморальные и цитотоксические Т-клеточные эпитопы [47]. Мутации в области иммунодоминантных цитотоксических Т-клеточных эпитопов помогают вирусу укрыться от защитных иммунологических реакций, играющих решающую роль в клиренсе вируса.

Точечные замены в S гене представляют особый интерес, так как они влияют на иммуногенность HBsAg, особенно “a” детерминанты, против которой вырабатываются нейтрализующие антитела. Пре-S1 и пре-S2 регионы высоко иммуногенны и являются потенциальными мишенями для селективного отбора со стороны иммунной системы [24, 64, 69]. Были обнаружены мутации в пре-S области, включая делеции, достигающие до половины целого пре-S1 региона, делецию пре-S2 трансляционного стоп-кодона, других кодонов, прекращающих экспрессию пре-S2 белка, многочисленные точечные мутации и серии небольших делеций и вставок [69, 80, 81, 83]. Некоторые делеции не только уничтожают регион пре-S2 промотора, но и сайты, которые распознаются В- и Т- клетками. Напротив, сайты, связанные с гепатоцитами, расположенные в пре-S1 области, остаются неизменными. Делеции такого типа приводят к нарушению клиренса

вируса при сохранении его способности прикрепляться к гепатоцитам с последующим проникновением внутрь клетки.

Мутации гена полимеразы могут быть связаны с формированием резистентности к терапии аналогами нуклеозидов и персистенцией вируса [32, 33, 54, 55, 56]. Ламивудин – потенциальный ингибитор РНК-зависимой ДНК полимеразы HBV, необратимо блокирующий обратную транскрипцию и подавляющий репликацию вируса. Продолжительная терапия ламивудином может привести к формированию резистентности в результате появления мутаций, которые разрушают YMDD locus в С домене гена полимеразы [35, 46, 69, 71]. Имеются сообщения и о мутациях гена полимеразы, которые могут быть связаны с вирусной персистенцией [28, 34]. Дисфункция полимераз, выражающаяся в неспособности к упаковке прегеномной РНК в ядерные частицы, является результатом missense (пропускающей) мутации в 5 регионе этого гена [63].

Белок Х гена принимает участие в многочисленных процессах, в том числе внутриклеточной передаче сигнала, транскрипции генов, клеточной пролиферации, репарации ДНК и апоптозе [13, 31, 28, 44]. Его разнородная транс-активирующая способность – одна из наиболее полно исследованных функций этого протеина. HBx активирует огромное количество вирусных и множество клеточных генов. Его транс-активационная деятельность осуществляется посредством активации факторов транскрипции, модуляции сигнальных путей в клетке, стабилизации РНК и нарушения нуклеоцитоплазматической транслокации [71, 75, 76]. Описано большое количество делеций Х гена, возможно ассоциированных с вариантами точечных мутаций [19, 35, 75, 82].

Наличие точечных мутаций отражается на серологическом профиле маркеров, не укладывающемся в обычную трактовку результатов, и на клиническом течении HBV-инфекции.

Так, в сыворотке пациентов, инфицированных pre-core мутантами, не содержится HBeAg а гепатоциты, пораженные мутантным вирусом, не

экспрессируют HBeAg на своей поверхности [64, 73, 75]. В связи с тем, что HBeAg – важная иммунологическая мишень, эти клетки не подвергаются киллингу, опосредованному иммунной системой хозяина [77]. По данным Г.И.Сторожакова [41], в структуре ВГВ доля заболеваний, ассоциированных с pre-core мутантом, составляет 7 – 30%. Мутации 1896 стоп-кодона часто встречаются у пациентов, с хроническим активным или неактивным гепатитом и у асимптоматических вирусоносителей в странах Средиземноморья и Востока [48, 56, 77, 73]. Напротив, эти мутанты редко встречаются в Северной Америке, Восточной Европе и Южной Африке [77]. Данная мутация часто встречается у пациентов с фульминантным гепатитом В, что первоначально навело на мысль о возможном влиянии на течение заболевания мутантного вируса [11, 13, 55]. Этот мутант, однако, не всегда выделяется у пациентов с фульминантным гепатитом В и может также вызывать само ограничивающийся острый гепатит В [73, 77].

Мутация в положении 1862 была выявлена у асимптоматических вирусоносителей и у пациентов с хроническим гепатитом, циррозом, ГЦК и фульминантным гепатитом [76, 80, 81]. Множественные точечные мутации core гена обнаружены у пациентов с ХГВ в странах Азии и Средиземноморья [19, 35]. Однако они редко встречаются у больных в Америке или белых британцев с ХГВ [80]. Было показано, что для ВГВ с развитием pre core мутанта характерна низкая активность, так как иммунный ответ на мутантный штамм выражен незначительно, и соответственно, активность некротически-воспалительных процессов в ткани печени невысока [34, 73]. При этом в сыворотке выявляются HBsAg, анти-HBe, ДНК-ВГВ [11, 33] и уровень вирусной нагрузки слабо коррелировал с клинико-биохимическими показателями гепатита. Следовательно, у большинства обследованных больных, инфицированных «HBeAg-минус» вирусом ГВ не наблюдается классической картины заболевания; клинические, биохимические, серологические показатели, уровень виремии и данные морфологических исследований указывают на атипичное течение гепатита В [10, 11].

Поиск мутантов S гена начался после того, как появились сообщения о пациентах, либо HBsAg-негативных анти-HBc и/или анти-HBs-позитивных, либо не имеющих маркеров ВГВ и содержащих ДНК ВГВ в сыворотке.

При проведении исследований в Сингапуре, Италии, Японии, Тайване, Индонезии и Брунее был обнаружен мутант, при котором отмечалась циркуляция HBsAg и анти-HBs одновременно [56].

В США у 23% инфицированных детей была обнаружена мутация в положении 142-145 [55]. Другие типы вакцин-ассоциированных мутантов были обнаружены в Японии, Гамбии (95 Karthigesu 1994). В районе Сингапура, проведенный в 1990-1992 годах, анализ отобранных образцов крови 2001 HBV-вирусоносителя без каких-либо симптомов заболевания, выявил присутствие HBsAg-отрицательных мутантов в 0,8% случаев [38, 73]. На сегодня зарегистрировано огромное количество мутантов, которые не распознаются коммерческими HBsAg-тестами. Способность и поликлональных и моноклональных HBsAg-тестов обнаруживать HBV мутантов в вiremической сыворотке из Папуа - Новой Гвинеи, Южной Африки и Сардинии исследовалась путем использования комбинации этих тестов. Было идентифицировано 16 новых мутантов и два новых эпитопных кластера [77]. Некоторые мутации в S и пре-S регионах, очевидно, связаны с развитием ГЦК [76, 82].

Описано большое количество делеций X гена. У HBsAg и HBeAg-негативных пациентов были описаны делеции, которые снижали активность пре-S промотора, что может быть причиной подавления секреции HBV белков [42, 69]. Отсутствие обычных серологических маркеров HBV – характерная особенность делеций и мутаций X гена.

Ядерный промотор играет центральную роль в репликации HBV и морфогенезе, управляя транскрипцией и прегеномной РНК и пре-core м - РНК. Ряд вариаций в ядерном промоторе ограничен в связи с его центральной ролью в вирусной репликации. Двойная мутация, трансверсия А на Т в 1762 положении и транзигция G в А – в 1764, часто встречается у пациентов с ХГВ

и реже – у асимптоматических носителей и у носителей без серологических маркеров HBV [67]. Действие, которое оказывает эта двойная мутация на вирусную репликацию, до конца не понятно. Мутация в 1653 положении часто встречается у пациентов с фульминантным гепатитом [73], а в 1753-1757 – у пациентов с фульминантным гепатитом или ГЦК [69], в обоих случаях в сочетании с двойной мутацией. Большое количество делеций в ядерном промоторе было описано в основном у пациентов с ХГВ, ГЦК, асимптоматических носителей и больных ВГВ без серологических маркеров. Большинство делеций приводит к сдвигу рамки считывания и усечению Х протеина на его С-окончании, что оказывает существенное влияние на его транс-активирующую функцию [80].

Разница в частоте обнаружения мутаций в различных географических областях объясняется преобладанием того или иного генотипа ВГВ на изучаемой территории.

1.3. Географическое распределение генотипов вируса гепатита В.

Генотип в общем определяется как генетическая структура организма или клетки. Если вирусы охарактеризованы на основе их геномных последовательностей, то речь идет о генотипах; если они характеризовались с позиций серологии, то речь идет о субтипах.

Циркулирующие в мире штаммы HBV неоднородны по антигенной характеристике HBsAg. Существование общей “а”-детерминанты HBsAg [13] и двух пар взаимоисключающих субтиповых детерминант d,y и w,r позволяет говорить о четырех субтипах: adw, ayw, agr, ayr [14]. “А”-детерминант-часть большого гидрофильного региона HBsAg и ее третичная структура определяет его антигенные свойства. Это эпитопный кластер HBV, с которым происходит связывание большинства анти-HBs, присутствующих в гипериммунной сыворотке [13, 16, 45, 58, 66, 70, 83]. Установлена гетерогенность детерминанты w, описаны также детерминанты q, x, g, что позволило идентифицировать 9 субтипов HBsAg: ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4, adrq-, adrq+ [18, 78].

Генотипами HBV называются изменения в геноме вируса, достигающие 8 и более процентов [46, 65, 78]. В настоящее время описаны 9 генотипов HBV: А, В, С, D, Е, F,G, H и w4В [78, 84, 86].

Генотипы HBV имеют характерное географическое распределение [43, 86]. Генотип А преобладает в Северо-Западной Европе, Северной Америке, на Филиппинах, Южной и Восточной Африке [30, 45, 62]. Генотипы В и С выявлены у больных в странах Юго-Восточной Азии [13, 16, 30, 68]. Генотип С преобладает в Японии, на Тихоокеанских островах [43, 84]. Генотип D обнаруживается во всем мире, но преобладает в Юго-Восточной Европе, Северной Америке, в Индии, в Восточной и Южной Африке [7, 16, 30]. Распространение генотипа Е ограничивается Западной и Южной Африкой [68]. Генотип F встречается в Южной и Центральной Америке [14, 20, 62]. Генотип G обнаружили во Франции, Германии и США [12, 13, 70], но он не встречается в Японии [13, 68]. Генотип H определяется в Никарагуа, Мексике, Калифорнии [43].

Naumann H. впервые описал новый вид генотипа, полный геном которого был выделен, клонирован, упорядочен и обозначен как w4В. Было обнаружено общее генетическое формирование типичных гепадновирусов с четырьмя «считывающими окнами», включающими пресеге регион. При сравнении w4В с 19 полными геномами HBV, было отмечено расхождение между ними на 15%, в то время как ранее сообщалось о расхождении в 11%. В отличие от 5 ранее известных генотипов HBV от А до Е, w4В еще имел связанный характер мутации, вне «считывающего окна».

Исследования, проведенные Carman W et al.[66] в Японии показали, что генотип А встречается в 4,7% случаев, генотип В – в 38,1%, генотип С – в 54,9%, генотип D – в 0,4% и F – в 0,6%. Генотипы Е и G не были выявлены. Изучение выявляемости генотипов HBV в Бразилии, Китае, Индии, Индонезии, Кении, Корее, Непале, Таиланде, на Филиппинах показало, что преобладает генотип С (33,9%), генотип А выявлялся в 25,6%, В – в 24,2%, D – в 11,7%. Генотипов Е и F среди них не было [146, 105]. В Таиланде

преобладает генотип С (54,4 %), В встречается в 23,5% случаев, а А – в 22,1%. В 45,6% выявляется субтип adw2 и в 54,4% - adr [84]. В США выявляются все генотипы, но преобладает генотип А и С, причем отмечается этническая зависимость [30, 58, 66, 86].

Образцы сыворотки крови 20 пациентов Индонезии [43] сравнили с образцами из других стран, включая Китай, Францию, Англию, Японию, США, СССР, Кению, Папуа новой Гвинеи и Филиппины. Авторы выделили 5 генотипов и относящиеся к ним субтипы. 12 субтипов принадлежали генотипу В (adw 7 и ауw 5), 13 – генотипу С (adw 1, adr 10, ауg и 1 ar 1), и 2 к генотипу D (ауw); и ничего не принадлежало генотипам А и Е.

В результате изучения последовательности нуклеотидов pre S/S гена вируса гепатита В – видов генотипов и субтипов, выделенных у жителей Рио-де-Жанейро, Бразилия [66], были определены 3 генотипа (А, D, F) и 9 субтипов (3 – adw 2, 3 – ауw 2 и 3 – ауw 3). Вызвал интерес тот факт, что присутствие аминокислотной мутации в pre-S регионе, характерное для Рио-де-Жанейро, не регистрировалось в других регионах мира.

Различие генотипов HBV и наличие мутаций пресоре региона были исследованы в 333-х образцах крови от носителей HbsAg и больных острым гепатитом В из 5 стран Центральной Америки (Коста-Рика, Никарагуа, Гондурас, Эль-Сальвадор и Гватемала) методом ПЦР [62, 65, 66, 68]. Генотипированием ограниченной последовательности в пределах S- гена, было выделено 90 видов, 66 из которых имели высокий уровень ДНК HBV, и 24 – низкий. 23 образца имели Hbe – положительные антитела. В результате исследования было выяснено, что генотип F был обнаружен в 71 (79%) сыворотке крови, А – в 13 (14%), D – в 5 (6%), и С – у одного донора из 90 сывороток. 18 больных с генотипом F имели антитела к HBe и ДНК HBV. Ранее были опубликованы 3 последовательности пресоре генотипа F с мутациями в различных участках. Преобладание генотипа F среди населения Центральной Америки оказалось неожиданным, и было расценено как характерное для американских индейцев Нового Света.

Той же группой авторов, в другом исследовании [43], изучена молекулярная эпидемиология вируса гепатита В среди жителей Центральной Америки, отраженная в генетических различиях малого S-гена. Были выделены 31 вид S –гена, принадлежащих генотипам А, С, D и F (4, 1, 4 и 22 вида соответственно) и сравнены с ранее опубликованными 104 видами генов. 21 вид генотипа F был закодирован как adw 4 и 1– как ауw 4. В пределах генотипа F прослеживались 3 группы, различие между которыми заключалось в изменениях в 45 аминокислотном остатке. Первая группа, включившая 18 видов генотипа F из Центральной Америки и 1 вид с Аляски, объединились по аминокислоте Thr в 45 позиции. Вторая группа включала 2 вида из Центральной Америки, 6 – из Южной Америки и Европы, и имели общий Leu 45. Два вида из Никарагуа отличались наличием Pro 45 в пятом замещении цепочки S – гена.

Авторы подчеркивают, что преобладание генотипа F могло бы стать причиной низкого распространения HBV в регионе, несмотря на высокую частоту гепатита А.

Подобные результаты были получены Ding X. et al.[78] при изучении антигенного разнообразия генотипа F HBV среди американских индейцев и других популяций Венесуэлы. Adw 4 подтип HBV относится к уникальной группе генотипа F, присутствующего у жителей Нового Света. В исследовании сравнивались образцы крови 141 носителя HBsAg среди американских индейцев и городских жителей Венесуэлы. Подтип adw 4 оказался значительно распространенным в изученном населении (75%). Среди американских индейцев встречаемость adw 4 составила 97%. Еще в 10% случаев встречался подтип adw 2, в тоже время другие подтипы (adw 3 и adw 4) обнаруживались лишь случайно. Таким образом, генотип F был довольно распространен (80%), особенностью которого для данного региона была его ассоциация с субтипами adw 2 и adw 4.

Несомненная научно-практическая роль изучения генотипов HBV и подтипов HBsAg в изучении эпидемиологии вирусного гепатита В. Но

остается не ясной ассоциация генетических характеристик с клиническими проявлениями генотипов.

По мнению Ding X et al.[78], Ferro A [86], от генотипов HBV зависит клиническое течение инфекции, ее прогноз.

Генотип А чаще выявляется у больных ХГВ, чем генотип D [70], и генотип С вызывает более тяжелые поражения печени, чем генотип В [43, 78], однако ГЦК в молодом возрасте чаще развивается у больных с ВГВ, у которых выявляется генотип В [68].

Исследования, проведенные Ding X et al.[78] в Японии и Тайване показали, что генотип С чаще регистрируется у больных с хроническим течением инфекции, характеризуется бедными клиническими проявлениями и ассоциируется с развитием ГЦК. У больных с ГЦК старше 50 лет выявляется чаще генотип С, чем у больных с ГЦК до 50 лет, у которых преобладает генотип В.

По мнению некоторых авторов у больных с ГЦК в более старшем возрасте, у которых преобладает генотип С, ГЦК развивается после цирроза. У молодых больных с ГЦК преобладает генотип В [66, 68].

Генотип А и D, преобладающие в Индии, чаще встречаются у больных с хроническим течением инфекции, а для генотипа D характерна его встречаемость у больных с носительством HBsAg (без клинических проявлений). Кроме того, генотип D вызывает развитие ГЦК в молодом возрасте [13].

Имеются сообщения о связи генотипов с клиническим течением инфекции. У больных с ОГВ чаще выявляется генотип В, чем у больных с ХГВ [46].

Исследования, проведенные Courouce - Pauty A.M et al.[72], показали, что из трех детей с ВГВ, зараженных матерью с субтипами adw2 и ayw, умерли двое, у которых определялся только субтип ayw, а ребенок с субтипом adw2 и ayw выжил.

Анализ фульминантного течения ВГВ у больных из Вьетнама показал, что большинство из них имеют генотип В. Чаще фульминантное течение наблюдается при ко-инфекции с HDV. Исследования, проведенные на севере Южной Америки, показали, что фульминантное течение наблюдалось у больных с генотипом HBV F вместе с HDV генотипом 3, а в Самаре (Россия) фульминантное течение вызвано генотипом D HBV и HDV генотипом 1 [13, 16].

Исследования, проведенные в Китае, показали, что HBeAg-позитивных было больше и анти-HBe меньше среди больных с ХГВ генотипом С, чем генотипом В. На более быструю сероконверсию HBeAg среди больных с генотипом В, в сравнении с генотипом С, указывали ряд авторов [66].

Повышение АлАТ чаще наблюдалось у больных с генотипом С, чем А и В [14, 16, 20]. С генотипами Д и В связаны pre-core мутации [20, 30, 58]. Core мутации связаны со всеми генотипами, но преобладают с генотипами А и С [39]. У больных с генотипом В цирроз выявлялся в 11,4 % случаев, а у больных с генотипом С – в 32,4 % [36].

Као J.H.et al. [87] изучили клинико-вирусологические характеристики доноров крови из Тайваня, инфицированных В и С – генотипами. Генотипы были определены среди 300 доноров крови с положительным поверхностным HBsAg, среди которых 10% имели повышенные уровни трансаминаз, 27% были положительны по HBeAg антигену, и еще 50 чел. (16.6%) – с отрицательным HBeAg. Распределение HBV-генотипов среди 264 носителей вируса было следующим: В – 221 (83.7%), С– 39 (14.8%), F – 1 (0.4%) и микст-генотипы – у 3-х (1.1%). Доноры с генотипом С склонны иметь более высокую частоту положительного HBeAg и высокий уровень ДНК в крови, в сравнении с генотипом А. В тоже время, частота мутаций в пресоре регионе оказалась значительно выше у HBeAg – отрицательных доноров, чем при положительном HBeAg, независимо от вида генотипа. В противовес этому, при генотипе С имела место редкая мутация в пресоре участке среди популяции Тайваня.

Таким образом, мутанты играют важнейшую роль в истории существования ГВ и есть основания полагать, что генетические вариации поддерживают HBV инфекцию [70].

Мутанты не до конца еще понятным способом связаны с эволюционным переходом к хронической форме заболевания и, возможно, имеют немаловажное значение в гепатокарциногенезе, развитии фульминантного гепатита и асимтоматическом течении HBV инфекции. На диагностическом уровне становится все более очевидно, что мутации HBV генома могут приводить к развитию инфекции с атипичной серологией [14, 30].

В патогенезе поражения органов, обусловленного HBV инфекцией, основополагающую роль играет взаимозависимость вируса и макроорганизма. Возникновение мутантов отражает попытки вируса избежать представляющих угрозу для его существования и выживания во враждебной среде механизмов. Последствия чего и для вируса и для организма хозяина непредсказуемы. Ответ же на инфицирование со стороны макроорганизма определяют его факторы-генетические, исходное состояние противовирусного иммунитета.

Вирус не представляет непосредственной угрозы для хозяина, так как он, в большинстве случаев, не обладает цитопатическим действием. Заражение вирусом провоцирует целый комплекс ответных иммунологических реакций хозяина. Врожденные иммунологические реакции включают активацию фагоцитов, натуральных киллеров и системы комплемента. В адаптивном иммунном ответе принимают участие В-лимфоциты, продуцирующие антитела; Т-хелперные клетки, распознающие вирусные антигены, представленные в комплексе с молекулами МНС II класса на поверхности антиген-представляющих клеток, пролиферирующие и продуцирующие цитокины, стимулирующие клеточный и гуморальный антивирусный иммунный ответ; цитотоксические CD8⁺ Т-клетки,

распознающие вирусные антигены, связанные с молекулами МНС I класса и антиген-представляющие клетки, включая макрофаги и дендритные клетки [3, 62, 70].

У пациентов с ХГВ происходит сбой в иммунной обороне [3]. Неэффективность иммунологических реакций, направленных против инфицированных гепатоцитов, может быть связана с несовершенством функционирования иммунной системы или успешной вирусной стратегией, например, образованием мутантов, позволившей избежать иммунологической атаки.

HBV варианты, возникшие в результате мутаций в пре-S/S регионе, способны избежать атаки антител. Кроме того, точечные мутации, удаленные от известных антигенных детерминант, могут вызывать конформационные изменения специфических эпитопов, что делает невозможным распознавание их антителами [84]. HBV, вызывающий хроническую инфекцию, должен также уклоняться от Т-клеточного ответа, приводящего к клиренсу вируса. Одним из мест изоляции вируса являются почки или поджелудочная железа, органы с микроваскулярными барьерами, которые предохраняют клетки-мишени от атаки HBsAg-специфических CTL. Точно также мозг, структуры глаза и яички являются иммунологически недостижимыми тканями с ограниченным доступом для Т-лимфоцитов. Плотность печеночной паренхимы также является фактором, ограничивающим доступ Т-клеток к HBV-инфицированным гепатоцитам, тем самым, препятствуя эффективному иммунному ответу [12]. Специфические мутации Т-хелперных эпитопов ядерного белка HBV могут нарушать или даже препятствовать распознаванию Т-клетками и, таким образом, аннулировать Т-клеточную активацию [45].

Тем же образом, мутации антагониста Т-клеточного рецептора CTL эпитопов могут вносить свой вклад в формирование вирусной персистенции [78]. Существуют и другие способы сделать вирус невидимым для

гуморальных и клеточных защитных реакций. Деятельность обратной транскриптазы позволяет встраивать HBV геном в ДНК клетки-хозяина, делая его недоступным для иммунной системы [87]. Мутации пре-С/С генов, приводящие к проявлению HBeAg-негативного HBV, так же должны квалифицироваться как мутации «иммунологического бегства», так как инфицированные гепатоциты, не экспрессирующие HBeAg на своей поверхности, более не рассматриваются как мишени [84].

Выживание мутантов HBV, появившихся в течение хронической инфекции, может зависеть от наличия многочисленных матриц. Некоторые мутанты способны к самостоятельной репликации, в то время как другие нуждаются для размножения в транс-активационных и рекомбинационных механизмах [65, 66]. Функциональное сосуществование мутантного типа и генетическая поддержка дикого типа могут быть необходимы в случаях, например, когда в гене полимеразы появляется стоп-кодон или когда делеции затрагивают ядерный белок [62].

HBV мутанты, способные избегать нейтрализации антителами, могут присутствовать в организме носителя в виде минорного компонента вирусной популяции, поэтому их трудно обнаружить даже после амплификации в ПЦР [3]. Большое число HBsAg мутантов, избегающих нейтрализации антителами, способно реплицироваться независимо. Некоторые из них обладают инфекционными свойствами [62].

1.4. Методы современной диагностики хронического гепатита В.

До настоящего времени в практической работе для диагностики ГВ обычно используют обнаружение в сыворотке крови HBsAg, HBeAg, HBcAg выявляемые с помощью ИФА [4, 12, 13, 16, 49]. Различают тест системы 1, 2, 3 и 4 поколений [7, 12, 83].

При разработке диагностикумов для тестирования HBV-DNA перед исследователями ставились две основные задачи: наиболее полное

выявления носителей вируса и как можно более раннее выявление антител при ОГВ, необходимое для правильной постановки диагноза [12, 13, 27, 49].

В отличие от диагностикумов 1-3 поколений, в препаратах 4 поколения объединены белки, полученные рекомбинантной и синтетической технологиями.

Диагностикумы каждого последующего поколения обладают большей чувствительностью и выявляемостью HBV-DNA .

Необходимо помнить, что даже препараты последнего поколения не могут выявить всех носителей ВГВ и определить антитела в первые дни ОГВ.

При определении HBV-DNA в некоторых случаях регистрируется ложнопозитивная реакция, чаще у больных онкологическими, ревматоидными, венерологическими и другими заболеваниями. Для разграничения ложнопозитивных образцов применяются дополнительные (Supplemental) тесты. В большинстве случаев, они представляют собой иммуноблотинг, что позволяет не только подтвердить позитивный результат, но и определить спектр анти-HBV.

Тем не менее, исследование спектра антител к белкам, кодированным различными зонами ДНК ВГВ, является одним из интересных направлений, результаты которого, возможно, позволят ответить на такие вопросы, как лабораторное разграничение острого и первично выявленного ХГВ, прогнозировать исходы заболевания [51, 50, 60].

Возможностью диагностики ВГВ на молекулярном уровне является индикация ДНК ВГВ. Основной метод детекции ДНК ВГВ - полимеразная цепная реакция (ПЦР).

ПЦР - это метод, с помощью которого выявляются определенные специфические участки генетической информации (ДНК или РНК) среди миллиардов других элементов [7, 74, 79].

Более высоким уровнем диагностики гепатита В является применение полимеразной цепной реакции (ПЦР) для индикации в сыворотке крови генома (ДНК) вируса гепатита В. При наличии репликативной фазы вируса гепатита В практически всегда с помощью ПЦР удастся найти ДНК HBV.

Тест-системы для выявления ДНК HBV и наборы для ПЦР выпускаются многими зарубежными фирмами ("Abbott" США, "Roche" Швейцария, "Organon teknica" Голландия и др.) и некоторыми отечественными производствами: "Биосервис" Москва, "Аквапаст" Санкт-Петербург, "Вектор Бест" Новосибирск и др. [13, 16, 29, 36, 43].

Метод был предложен в 1983 году американским биохимиком Кэри Мюллисом. ПЦР нашла применение в изучении наследственных болезней, онкологии, трансплантологии, судебной медицине, криминалистике, биологии, археологии, т.е. практически во всех сферах человеческой деятельности [16]. В последние годы она широко используется в диагностике инфекционных заболеваний [36, 43, 49, 53, 60].

Принцип метода состоит в том, что специфический участок искомой ДНК (РНК) умножается в миллионы раз. Тем самым достигается супервысокая чувствительность: 10-100 молекул. Число молекул в 1 мл образца после многократного клонирования возрастает в 10^6 - 10^8 раз [68].

Обнаружение в крови ДНК ВГВ является единственным арбитражным критерием, характеризующим вирусемию, свидетельствующую о продолжающейся репликации HBV [74].

Достоверным критерием является обнаружение ДНК в печени больного. Методы качественного определения ДНК HBV в сыворотке крови можно определять с помощью амплификационных методов, таких как полимеразная цепная реакция (ПЦР) или транскрипционно опосредованная амплификация (transcription-mediated amplification - ТМА). Примерами коммерческих тест-систем ПЦР для количественного определения ДНК HBV являются Amplicor Hepatitis B Virus Test, версия 2.0, и Cobas Amplicor Hepatitis B Virus Test,

версия 2.0 (Roche Molecular Systems, США), порог чувствительности которых составляет около 50 МЕ/мл [24,44].

Определить количество ДНК HBV в крови можно с помощью методов амплификации мишени (ПЦР. ТОА) или методов амплификации сигнала (Branched DNA). Определение уровня ДНК HBV помогает предсказать вероятность ответа на терапию, а оценка изменений уровня ДНК HBV на фоне лечения может использоваться для контроля ответа на терапию. Следует отметить, что результаты, полученные при использовании этих методов, с целью стандартизации данных следует выразить в международных единицах (МЕ), хотя динамические диапазоны у различных методов различаются, что может затруднять сравнение данных.

Учитывая, что изменение уровня ДНК HBV используется для контроля ответа на терапию, важно в начале лечения определить точный уровень ДНК HBV а не просто подтвердить, что он превышает верхнюю границу определяемого диапазона. Это связано с тем, что иногда уровень ДНК HBV у пациента превышает линейный диапазон используемых в настоящее время методов количественного определения.

Для адекватной интерпретации данных также важно, чтобы на протяжении всего периода лечения у одного пациента использовался один и тот же метод количественного определения ДНК HBV [16, 27, 49].

В настоящее время известно 9 генотипов вируса гепатита В. Несмотря на то, что исход HBV-инфекции не зависит от генотипа, однако знание его позволяет предсказать вероятность ответа на терапию и во многих случаях определяет ее длительность [16, 60, 79, 83].

Генотипирование может проводиться путем прямого секвенирования, обратной гибридизации с зондами, специфичными для определенных генотипов, или с помощью определения полиморфизма длины рестрикционных фрагментов.

Генотипирование HBV у одного пациента проводится однократно, повторное тестирование не требуется.

Таким образом, приведенные данные литературы показывают, что определение генотипа HBV - инфекции играет большую роль не столько для оценки вероятности прогрессирования хронического гепатита, сколько для определения продолжительности противовирусной терапии, прогноза результатов лечения и тяжести течения.

ГЛАВА II.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Для решения поставленных в работе задач в течение 2008-2010 годов на кафедре детских инфекционных болезней ТашПМИ проведено обследование у 30 детей больных с ХВГВ. Клинические исследования проведены в клинике НИИ Вирусологии и в №5 инфекционной больнице города Ташкента.

2.1. Общая характеристика больных.

Диагноз ХВГВ устанавливали в соответствии с приказом МЗ РУз № 560 от 30 октября 2000 «О мерах по снижению заболеваемости вирусными гепатитами в Республике».

Больные ХВГВ, как правило, госпитализировались на 1-5 день от начала обострения и в периоде разгара заболевания. Больные ХВГВ госпитализировались в фазе обострения заболевания, также наблюдались амбулаторно.

Диагноз ХВГВ основывался на клинических проявлениях: постепенном начале заболевания, циклическом развитии болезни, характерных особенностях интоксикационного и диспепсического синдромов, гепатомегалии; данных эпидемиологического анализа—парентеральные вмешательства в течение последних 6 месяцев, контакт с больными ОВГВ; лабораторных исследованиях—характерных изменениях биохимических показателей и серологических данных (обнаружение HBsAg, анти-HBc IgM в сыворотке крови). Для строгой верификации диагноза и исключения других вирусных гепатитов проводили исследование сыворотки крови на анти-HAV IgM и анти-HDV IgM.

Анализ анамнестических данных детей с ХВГВ показал, что у 16 (53,3%) заболевании развилось в исходе острой манифестной HBV-инфекции. У остальных 14 (46,7%) детей имел место первичный-хронический гепатит В без начальной манифестации. С сформированный ХВГВ у данных больных был диагностирован после выявления HBsAg, повышенной активности

трансаминаз в крови, гепатомегалии при обследовании по поводу интеркуррентного заболевания, при обследовании в связи с контактом с больным гепатитом В.

В таблице 2.1.1 представлена половая, возрастная характеристика наблюдавшихся детей.

Возрастно-половая структура больных ХВГВ

Таблица - 2.1.1

Возраст	Больные ХВГВ		Всего
	Мальчики	Девочки	
10—14	21(70%)	9(30%)	30

Как следует из данных таблицы, ХВГВ диагностировался у детей от 10 –до 14 лет. ХВГВ встречался чаще в 2,5 раза у мальчиков. У подавляющего большинства детей (80%) с ХВГВ были выявлены причины заражения. У 20 % детей возможные источники инфицирования не были установлены.

Согласно критериям, принятым международным совещанием гепатологов (Лос-Анжелес,1994), у 12 (40,0%) детей была диагностирована минимальная, у 6 (20%)-низкая, у 9 (30%)-умеренная и у 3(10%)-выраженная активность процесса в печени (диаг-2.1.1). При постановке диагноза использовали ультразвуковые критерии стадий фиброза печени при хроническом гепатите у детей.

У обследованных детей были выявлены сопутствующие заболевания, среди которых анемия у 7(23,3%)-с ХВГВ, хронический тонзиллит у 2(6,7%) соответственно, бронхит-у 3 (10,0%), пневмония-у 7(23,3%). Среди детей с ХВГВ встречались острый гломерулонефрит и хронический холецистит у 2 (6,7%) детей (диаг-2.1.2).

2.2. Методы исследования.

У всех детей, находящихся под нашим наблюдением, проводилось комплексное лабораторное и инструментальное обследование, которое включало клинические, биохимические, серологические, иммунологические, ультразвуковые исследования и молекулярно-генетическое.

Клиническое обследование предусматривало сбор анамнестических данных, включающий выяснение сроков и характера начала заболевания, оценку общего состояния, изменений со стороны желудочно-кишечного тракта, сердечно-сосудистой системы, дыхательной, нервной системы и установления степени их поражения.

При поступлении в стационар и в динамике заболевания всем детям проводились общеклинические анализы крови и мочи. Анализ мочи включал определение суточной экскреции белка, эритроцитов, лейкоцитов.

Биохимические исследования включали определение общего белка в крови с использованием рефрактометрического метода, белковых фракций методом электрофореза на бумаге. ПТИ определяли по унифицированному методу Квинка. Содержание общего билирубина и его фракций определяли методом Ендращeka и Клеггорна. Исследование активности трансаминаз (АлТ и АсТ) проводилось методом Райтмана-Френкеля, тимоловая проба-методом Маклагана, щелочная фосфатаза-по Боданскому. Биохимические исследования проводились в лаборатории НИИ Вирусологии и при НИИ Иммунологии АН РУз (использовался биохимический анализатор «Roche»).

Всем обследованным выполнялось ультразвуковое исследование почек, печени и желчевыводящих путей на аппарате АЛОКА D-630 (Япония) линейным (5 МГц) и конвекционным (3,5 МГц) датчиками.

Серологические исследования. Определение маркеров и генотипирование вируса гепатита В проводилось в Лаборатории генотипирования им. Р.М.Рузыбакиева НИИ Иммунологии АН РУз

(директор проф. Т.У.Арипова) и Лаборатории генотипирования Нагойского Университета, Япония (Department of Laboratory of Medicine, Nagoya City University Medical School, руководитель проф. М.Мизоками). Определение HbsAg и антител к нему, анти-HBc, анти-HDV, анти-HAV проводилось с использованием коммерческих тест-систем “Serodia” (Fujirebio, Tokyo, Japan), основанной на методе пассивной агглютинации чувствительных желатиновых частиц. Чувствительность данных тест-систем 0,3 нг/мкл. Считывание результатов проводилось после одного часа с момента постановки. Позитивным результатом к HBsAg считалось его наличие в разведении $1:10^{-2}$. Сомнительные результаты верифицировали тестом на разведение от $1:10^{-2}$ до $1:10^{-12}$. В работе использованы плашки Тарасаки.

Определение HBeAg и HBeAb проводилось с использованием коммерческих тест-систем “Serodia” (Kokusai-Shiyahu, Tokyo, Japan), “Вектоген Д – антитело стрип”, “Векто HbsAg антитело стрип», «Вектоген HBs-антиген стрип» («Вектор-бест» г.Новосибирск) методом ИФА, основанной на принципе «сэндвич». Чувствительность тест-систем 8,0 пг/мл. Считывание результатов проводилось с использованием аппарата ELSIA F-300 (Kokusai - Shiyahu, Tokyo, Japan).

Серологическое определение генотипов вируса гепатита В проводилось ИФА методом с использованием моноклональных антител к специфическим эпитопам кодируемым pre S2-регионом (HBsAg subtype EIA, Institute of Immunology, Tokyo, Japan).

Данный метод основан на использовании пяти моноклональных антител – b, m, k, s, и u, принцип «сэндвич». Эпитоп b в HBsAg встречается во всех генотипах и его детекция характеризует презервацию продукта pre-s регионов, который является высоко-чувствительным к протеиназам. Так как экспрессия четырех эпитопов зависит от генотипа вируса гепатита В, то определение шести генотипов проводится их комбинацией: bsu характерно для генотипа А, bm – для генотипа В, bks – для генотипа С, bksu – для D и E и

bk –для генотипа F. В связи с тем, что генотипы D и E имеют идентичные серотипы–bksu, в работе использованы два дополнительных антитела к эпитопам f и g. Таким образом, отдифференцирован генотип E от генотипа D, эпитопными вариантами bksug для D генотипа и вариантами bksufg для генотипа E.

ПЦР-генотипирование проводилось методом PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism - полиморфизм рестрикционных фрагментов отрезков) S гена вируса гепатита В.

Экстракция ДНК из 100 мкл сыворотки исследуемого образца проводилась с использованием коммерческих наборов (Smitest EX R&D Sumitomo Metal Industry, Tochigi, Japan).

Процесс ПЦР-генотипирования состоит из двух раундов: первый раунд – 5 мкл раствора ДНК каждого исследуемого образца были амплифицированы с использованием праймеров MF1(sense: 5'-YCC TGC TGC TGC CTC CAG TTC-3': nt.57-77) и MR2 (antisense: 5'-AAG CCA NAC ART GGG GGA AAG C-3':nt.771-732). Амплификация проводилась Tag-полимеразой AmpliTag Gold (Applied Biosystems, CA, USA). Образцы денатурировались при температуре 96°C–9 минут (1 температурный режим), 40 циклов–95°C 1 мин,60°C–1 мин, 72°C–1 мин. Экстенция проводилась при температуре 72°C–5 минут. ПЦР генотипирование осуществлялось с использованием девяносто-шести луночного термоциклера (GeneAmp 9600, Perkin Elmer, Norwalk, USA).

Второй раунд ПЦР–2 мкл амплифицированного продукта типировалось с праймерами MF2 (GTC TAG ACT CGT GGT GGA CTT CTC TC –3':nt.248-273) и MR2 (antisense : 5'-AAG CCA NAC ART GGG GGA AAG C-3':nt.771-732) Продукт второго раунда ПЦР-генотипирования, длина которого составляла 485 пар оснований, был проведен с использованием пяти видов рестрикционных энзимов. Генотипы A и D определялись энзимом NlaIV, генотип A определялся разрезанием энзимом NlaIV в положении с 510 по

512 нуклеотид, фрагментами длиной 220 и 265 пар оснований. Генотип D определялся разрезанием энзимом NlaIV в положении с 139 по 145 нуклеотид, фрагментами длиной 34, 186 и 265 пар оснований. EARI энзим применялся для детекции генотипа В. Энзим AlwI определял генотип С. Энзим NciI применялся для определения генотипов Е и F в положении с 707 по 711 нуклеотид. Однако, генотип F не имеет распознавания энзимом NphI в позиции с 337 по 341 нуклеотид. Продукты амплификации регистрировались с помощью электрофореза. Электрофоретический буфер использованный в работе был 1×TBE (134mM Tris-HCl, pH 10; 68 mM борная кислота; 2.5 mM EDTA) с добавлением 500 нг этидиума бромида. Прогон ампликонов проводился в 3% агарозном геле с использованием ультрафиолетовом света.

Нуклеотидная расшифровка S гена вируса гепатита В проводилась с использованием метода терминации диоксидов (Dye Terminator Cycle Sequencing F×S Ready Reaction Kit, Perkin-Elmer Cetus), ДНК сиквенатор, использованный для детерминации S гена был ABI Prizm 377 DNA Sequencer Perkin-Elmer Cetus.

Количество нуклеотидных замещений сиквенированных образцов исследовалось с помощью шестипараметрового метода и филогенетические варианты конструировались с использованием компьютерной программы ODEN версия 1.1.1.

ГЛАВА III.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ.

Хронический гепатит В у детей – широко распространенное тяжелое заболевание, течение которого отличается чрезвычайной вариабельностью клинических симптомов, различными темпами прогрессирования в зависимости от степени репликативной активности вируса и непредсказуемостью исходов вплоть до развития цирроза печени и ГЦК. Течение ВГВ зависит не только от факторов, определяющих состояние макроорганизма. Большое значение имеет вирус, в частности его генотипические варианты.

Нами обследовано 30 детей с диагнозом «хронический вирусный гепатит В», в возрасте от 10 года до 14 лет. Среди находившихся под наблюдением больных было 21 мальчиков (70%) и 9 девочек (30%).

Анализ анамнестических данных 30 детей показал, что у 16 (53,3%) ХВГВ развился в исходе острой манифестной HBV-инфекции.

У остальных 14(46,7%) детей, видимо, имел место первично-хронический гепатит В без начальной манифестации. Сформированный ХВГВ у данных больных был диагностирован после выявления HBsAg, повышенной активности трансаминаз в крови, гепатомегалии при обследовании по поводу интеркуррентного заболевания, при обследовании в связи с контактом с больным гепатитом В, при заболевании гепатитом А.

Для определения генотипов HBV, нами исследовались дети, у которых ПЦР на ДНК вируса была положительной.

Как показали наши исследования, у 21 (70%) детей был обнаружен D-генотип, у 5 (16,7%) – А-генотип и у 4 (13,3%) – С-генотип (диаг-3.1).

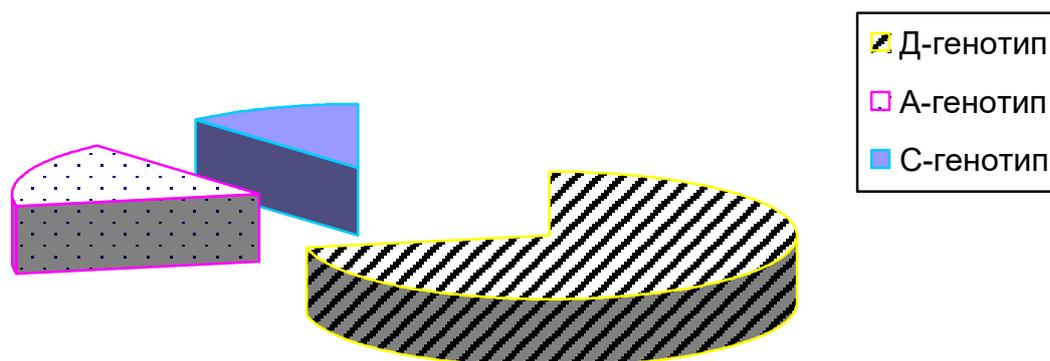


Диаграмма - 3.1.

Распределение генотипов у детей с ХВГВ.

Как показали наши исследования, у 21 (70%) детей был обнаружен Д-генотип, у 5 (16,7%) – А-генотип и у 4 (13,3%) – С-генотип (диаг-3.1).

Обследованные дети были различных популяций, проживающих на территории Узбекистана. Среди них представители узбекской популяции составили 70%, корейской – 10% и русской – 20%.

Генотипы, с учетом национальности обследованных детей, распределялись следующим образом: Д-генотип был выявлен у 21 (70%) детей всех популяций, но больше у узбекской – в 70 % случаев; также у 10 % корейской и у 20% русской популяций. А-генотип встречался у 5(16,7%) детей всех популяций: чаще у русской - в 40% случаев, у корейской - в 20% и у узбекской - в 40 % случаев. С-генотип встречался у 4(13,3%) детей только корейской популяции.

Таким образом, преобладающим генотипом среди обследованных детей является Д-генотип. Генотип-С, вероятно, был завезен в 40-х годах XX столетия на территорию Узбекистана департаментами с Дальнего Востока, где преобладающим является С-генотип.

Согласно критериям, принятым международным совещанием гепатологов (Лос-Анжелес, 1994), у 12 (40,0%) детей была диагностирована

минимальная, у 6 (20%)-низкая, у 9(30%)-умеренная и у 3 (10%)-выраженная активность процесса в печени.

При дальнейшем клиническое исследование с учетом активности процесса выявили следующее; у детей Д-генотипом в 40% регистрировалась минимальная активность, в 20%- низкая, в 30 % - умеренная активность и в 10% выраженная активность. Среди детей с А-генотипом в большинстве процентов случаев (80%) определялась минимальная активность и в 20% - низкая активность. У половины детей с С-генотипом выявлялась умеренная активность, в 25 % - выраженная и в 25% - низкая активность. Следовательно, тяжелее заболевание протекает у детей с С-генотипом, в сравнении с А- и Д-генотипами и легче у детей с А-генотипом, в сравнении с Д- и С- генотипами.

3.1.Клинико-лабораторные показатели детей с Д-генотипом HBV.

С учетом активности процесса для анализа клинико-лабораторных показателей 21 больных с Д-генотипом были распределены на 4 группы: 1 группу составили 8 больных с минимальной активностью, 2 группу–6 больных с низкой активностью, 3 группу–5 больных с умеренной активностью и 4 группу – 2 больных с выраженной активностью (диаг-3.1.1).

Биохимические показатели в периоде обострение ХВГВ представлены в таблице 3.1.1.

Как видно из представленных данных, 4(50%) детей 1 группы жаловались на слабость, быструю утомляемость. Ухудшение аппетита отмечалось у 1(12,5 %) детей. Увеличение печени регистрировалось у 7 (87,5 %) обследованных, причем у 2(25%) она выступала на 2см и у 1(12,5%) – на 2-5см из-под реберной дуги.

В большинстве случаев консистенция органа расценивалась как умеренно плотная. Увеличение селезенки отмечалось у 6 (75%) детей. При этом край селезенки выступал из подреберья на 0,5-1см и был плотно-эластической консистенции.

Внепеченочные знаки регистрировались редко и были представлены телеангиэктазией у 1 (12,5%) больного с локализацией на лице, шее и кистях, а также пальмарной эритемой у 2 (25%) обследованных.

Из биохимических показателей у детей 1 группы отмечалось достоверное повышение активности АлАТ и АсАТ (табл. 3.1.1). Среднее значение АлАТ составило 0,7 ммоль/л, а среднее значение АсАТ– 0,35ммоль/л. Более ярко изменялись показатели γ -глобулинов, щелочной фосфатазы, тимоловой пробы.

Таблица- 3.1.1

Биохимические показатели в периоде обострения ХВГВ у детей с Д-генотипом HBV.

Биохимическ. показатели	1 группа n-8	2 группа n-6	3 группа n-5	4 группа n-2
Общий билир мкмоль/л	11,5	11,7	22,6	29,4
Конъюг. бил. мкмоль/л	3,1	3,3	8,2	10,4
АлАТ ммоль/л	0,7	0,95	1,9	3,8
АсАТ ммоль/л	0,35	0,47	1,05	2,2
ПТИ %	89,9	86,2	82,8	78,4
Альбум. %	47,8	43,4	43,9	37,2
Г-глобул. %	16,5	17,1	18,6	22,4
ЩФ, ммоль/л	4,2	5,6	5,9	6,8
Тим.Проба ед	2,8	3,1	3,9	4,2

У половины детей 2 группы период обострения проявлялся жалобами на быструю утомляемость, ухудшение самочувствия, слабость,

раздражительность. Ухудшение аппетита отмечали 2 (33,3%) детей, 2 (33,3%) ребенка жаловались на повторяющиеся тупые боли в верхней части живота. Увеличение печени регистрировалось у всех детей данной группы: у 3 (50%) больных она выступала до 2см, у 3 (50%) – от 2 до 5см. У половины детей консистенция органа расценивалась как плотноватая. Увеличение селезенки было у 3 (50%) детей: у 2 (33,3%) она выступала из-под реберной дуги не более чем на 1см, а у 1 (16,7%) – на 1-3см. У большинства детей селезенка была плотноватой консистенции.

Внепеченочные знаки регистрировались у 5 больных, у 3 (50%) – это были телеангиэктатические мелкие и крупные элементы с локализацией на лице и кистях и у 2 (33,3%) – пальмарная эритема.

Клиническая симптоматика у детей 3 группы была более выражена. Жалобы на быструю утомляемость, слабость, нарушение сна, потливость предъявляли 2 больных обследованных, ухудшение аппетита отмечали 60% детей, на появление поташнивания жаловались 1 ребенок, болевой абдоминальный синдром регистрировался также у 1 обследованного. У 20% детей наблюдалась желтуха, которая чаще была представлена субиктеричностью или легкой иктеричностью кожи и склер.

Ведущим и постоянно диагностируемым клиническим признаком было увеличение печени: у 1 ребенка она выступала до 2 см, у 33,3% - от 2 до 5 см и у 33,3% - более чем на 5 см. из-под реберной дуги. У 2 детей консистенция органа была плотная. У 66,6 % детей пальпировалась селезенка: у 33,3% она выступала из-под реберной дуги не более чем на 1 см, у 33,3% - на 1-3 см и у 33,3% - более чем на 3 см.

Из внепеченочных проявлений регистрировались телеангиэктазии у 1 ребенка и у 2 детей – пальмарная эритема.

У двух детей данной группы регистрировался геморрагический синдром, проявляющийся эпизодическими носовыми кровотечениями.

Анализ биохимических данных показал незначительные колебания общего билирубина, среднее значение которого составило 22,6 мкмоль/л, что

достоверно выше контрольных показателей. Достоверно выше был и средний уровень конъюгированного билирубина. Из энзимологических изменений обращало на себя внимание повышение в 5,6 раза активности АлАТ и АсАТ. У детей данной группы отмечалась диспротеинемия за счет увеличения γ -глобулиновой фракции сыворотки крови при нормальном содержании альбуминов. Показатели щелочной фосфатазы были повышены, как и показатели тимоловой пробы. ПТИ был достоверно снижен.

Клинические проявления детей 4 группы были наиболее выраженными. Симптомы интоксикации, такие как вялость, слабость, нарушение сна были у 100% детей. Ухудшение аппетита отмечалось у 2 детей, чувство тошноты – у 50%. Половина обследованных больных жаловались на боль в животе.

Желтуха отмечалась у 50% детей и характеризовалась как умеренная.

У всех детей данной группы определялась гепатомегалия: у 1 (50%) печень выступала на 2 см, у 1 (50%) – от 2 до 5 см из-под реберной дуги. Более чем у половины детей консистенция печени расценивалась как плотная, у остальных – очень плотная. У 100% детей пальпировалась селезенка: у 50% она выступала из-под реберной дуги не более чем на 1 см, у 50% - на 1-3 см. У половины детей селезенка была плотной консистенции.

У 50% детей имелись множественные телеангиэктазии, локализованные на лице, шее, передней поверхности грудной клетки, кистях. Пальмарная эритема встречалась у 100% обследованных.

Геморрагический синдром диагностировался у 100% детей и проявлялся эпизодическими носовыми кровотечениями у 50% и также у 50% проявления геморрагического синдрома сводились к синякам на конечностях.

Что касается биохимических показателей больных 4 группы, уровень общего и конъюгированного билирубина в сыворотке крови был увеличен и составил соответственно 29,4 и 10,4 мкмоль/л. Гиперферментемия была выражена в значительной степени: показатели АлАТ составили 3,8 ммоль/л, а АсАТ – 2,2 ммоль/л, что более чем в 10 раз выше контрольных значений. Уровень альбуминов уменьшился до 37,2%, а уровень γ -глобулинов

увеличился до 22,4%. Повышенными были показатели щелочной фосфатазы, тимоловой пробы. ПТИ снизился до 78,4%.

Анализ серологического профиля обследованных больных с Д-генотипом показал, что у всех детей определялся HBsAg, HBeAg - у 15 (71,43%), анти-HBe – у 2 больных, ПЦР была положительной у всех детей.

В качестве иллюстрации приводим следующий пример.

Ходжиақбар Х., 12 года (ист.б-ни 58/1118) поступил в клинику 25.01.09. с диагнозом хронический гепатит В. Начало настоящего заболевания относится к 2004 году, когда 7 лет перенес острый ВГВ. Причина заражения не была установлена. В июне 2004 года мать обратила внимание на отсутствие аппетита, ребенок стал вялым, беспокойным, плохо спал. При поступлении в клинику ребенок заторможен, сознание ясное, вялый. Температура тела нормальная, зев без изменений, со стороны легких и сердечно-сосудистой системы отклонений не выявлено. При пальпации: печень выступала из-под реберной дуги на 2,5см. Селезенка не пальпировалась. Данные биохимических исследований: АлАТ-2,0 мкмоль/л, АсАТ-1,1 ммоль/л, билирубин-17,0 ммоль/л, общий белок-66,6 г/л, щелочная фосфатаза-9ммоль, ЛДГ-564 Е/л, мочевины-8,6 ммоль/л, креатинин-20 ммоль/л. Клинический анализ крови: гемоглобин-118 г/л, эрит.- $3,8 \times 10^{12}$ /л, лейкоц.- 9×10^9 /л, э-6 %, с-я-41 %, лимф.-42 %, п/я-2, м-2, тромбоциты – 218 тыс. в 1 мкл, СОЭ-6 мм/ч. Серологическое обследование крови: обнаружен HBsAg, HBeAg, анти-HBc (сумм.), ПЦР на ДНК HBV положительна. При генотипировании выявлен генотип Д.

Данные УЗИ: печень типично расположена. Край ровный, острый. Размеры: 15,7x7,7x5,8 см. Левая доля выступает из-под края реберной дуги +4,0, правая доля - +3,5см. Структура однородная. Паренхима незначительно уплотнена. Селезенка: размеры 7,7x4,6 см. Структура однородная. Установлен клинический диагноз: хронический вирусный гепатит В, репликативная стадия, умеренной активности.

Особенностью данного случая явилось развитие хронического течения ВГВ после перенесенного острого ВГВ в 8 месячном возрасте. Несмотря на низкую биохимическую активность процесса, изменения на УЗИ печени, селезенки, а также выявленные маркеры ВГВ указывают на активную репликацию вируса.

3.2. Клинико-лабораторные показатели детей с А-генотипом HBV.

С учетом активности процесса дети с А-генотипом были разделены на 2 группы: в 1 группу вошли 3 детей с минимальной активностью и во 2 группу – 2 детей с низкой активностью ВГВ.

Биохимические показатели детей данной группы в период обострения представлены в таблице (3.2.1).

Таблица -3.2.1

Биохимические показатели в период обострения ХВГВ у детей с А-генотипом.

Биохимические показатели	1 группа n-3	2 группа n-2
Общий билирубин мкмоль/л	13,8	17,4
Конъюг.билирубин мкмоль/л	3,6	3,9
АлАТ ммоль/л	0,68	0,93
АсАТ ммоль/л	0,31	0,48
ПТИ %	90,4	88,4
Альбумины %	49,4	44,8
Г-глобулины %	14,8	17,3
Щелочная фосфат, ммоль/л	3,8	4,6
Тимоловая проба ед.	2,6	2,9

В период обострения 2(40,0%) детей 1 группы жаловались на слабость, утомляемость, а 2 детей-на плохой аппетит. У 4(80%) детей регистрировалась

гепатомегалия: у 2 (40 %) печень выступала на 2см и у 2 (40 %)-на 2-5см из-под реберной дуги. У большинства консистенция печени была плотноватой. Увеличение селезенки было у 3(60 %) детей. Край селезенки выступал из-под ребры не более 1см.

Из энзимологических сдвигов обращает на себя внимание повышение активности АлАТ и АсАТ (табл-3.2). Среднее значение АлАТ составило 0,68 ммоль/л, а среднее значение АсАТ - 0,3 ммоль/л, что в 2 раза больше контрольных показателей.

Период обострения у 60% детей 2 группы проявлялся умеренно выраженными симптомами интоксикации: повышенной утомляемостью, раздражительностью, нарушением сна. На плохой аппетит жаловались 20% детей. Увеличение печени регистрировалось у всех больных данной группы, причем у 80% она выступала до 2см, а у 20% - от 2 до 5см. У половины детей консистенция органа расценивалась как плотноватая, а у остальных – плотная. У 40% обследованных детей была увеличена селезенка: у всех она выступала из-под реберной дуги не более чем на 1 см. Внепеченочные знаки регистрировались у одного больного.

Из биохимических показателей обращало на себя внимание достоверное увеличение активности АлАТ в 2,7 раза и АсАТ в 3 раза относительно контрольных значений.

Серологические исследования показали, что у всех детей с А-генотипом выявлялся НВsAg, НВеAg, ПЦР была положительна.

В качестве иллюстрации приводим наблюдение за больным с А-генотипом ХВГВ.

Абдумалик М, 14 года (ист. б-ни 1958) из Шайхантаурского района г.Ташкента поступил в клинику 31.04.09 с жалобами на вялость, отсутствие аппетита, плохой сон. Со слов матери, ребенок болен в течение недели, когда мать обратила внимание на вялость, капризность, плохой аппетит. Через 2 дня обратились к участковому врачу, который направил на сдачу крови на ферменты. Ферменты были повышены. Ребенок направлен на стационарное

лечение. Причину данного заболевания выяснить не удалось. При осмотре ребенок адекватен, несколько вял. Зев спокойный, со стороны легких и сердечно-сосудистой системы отклонений не выявлено. Печень выступает из-под реберной дуги на 2,0см. Селезенка не увеличена. Данные биохимических исследований: АлАТ-0,7 ммоль/л, АсАТ-0,19 ммоль/л, билирубин - 8,8 мкмоль/л, общий белок-65,5 г/л, альбумины-48%, γ -глобулины-14%. Клинический анализ крови: гемоглобин-112г/л. эрит.- 4×10^{12} /л, лейкоц.- $9,6 \times 10^9$ /л, лимф.-34%, СОЭ-2 мм/ч. Серологическое обследование: выявлялся HBsAg, HBeAg, HBc(сум), ДНК-НВV, А-генотип. УЗИ: печень несколько увеличена за счет правой доли. Контуры четкие, ровные, поверхность гладкая. Паренхима уплотнена с диффузно повышенной эхогенностью. Установлен клинический диагноз: хронический вирусный гепатит В, репликативная стадия, минимальной активности.

Особенностью данного случая было первично-хроническое формирование гепатита В, который был диагностирован по поводу обострения заболевания. Наличие серологических маркеров позволили выявить этиологическую причину имевшегося хронического гепатита у ребенка.

3.3.Клинико-лабораторные показатели детей с С-генотипом НВV.

Дети с С-генотипом с учетом активности процесса были разделены на 2 группы: в 1 группу вошли 2 детей с умеренной активностью и во 2 группу – 2 детей с выраженной активностью ВГВ. У двух детей был ХВГВ низкой активности. Клинические симптомы и биохимические показатели детей с С-генотипом в период обострения представлены в таблице 3.3.1.

Период обострения у 50 % детей 1 группы проявлялся умеренно выраженными симптомами интоксикации. Отмечалась повышенная утомляемость, раздражительность, нарушение сна. На плохой аппетит жаловались 50 % детей. Эпизодические боли в области эпигастрия отмечались у 25 %. Диагностируемым клиническим признаком у всех детей данной группы была гепатомегалия: у 25% детей печень выступала до 2 см, у

50 % - от 2 до 5 см и у 25 % печень пальпировалась более чем на 5 см из-под реберной дуги. У 75 % детей консистенция органа расценивалась как плотная, а у 25 % - как очень плотная. У 75 % детей пальпировалась селезенка: у 50 % она выступала из-под реберной дуги не более чем на 1 см, у 25% - на 1-3см. У 2 детей селезенка была плотной. У 25 % детей имелись множественные телеангиэктазии, у 75 % была пальмарная эритема.

У детей 1 группы отмечалась гиперферментемия: показатели АлАТ составили 2,4 ммоль/л, что в 7 раз выше контрольных значений, а АсАТ – 1,3ммоль/л, больше контрольных значений в 8 раз. Достоверно увеличился уровень γ -глобулинов .

У детей 2 группы клинические проявления были наиболее выраженными. Симптомы интоксикации, такие как вялость, утомляемость, плаксивость, нарушение сна были у всех детей, как и жалобы на плохой аппетит.

Таблица -3.3.1

Биохимические показатели в период обострения ХВГВ у детей с С-генотипом.

Биохимические показатели	1 группа n-2	2 группа n-2
Общий билирубин мкмоль/л	15,4	18,75
Конъюг.билирубин мкмоль/л	3,2	3,8
АлАТ ммоль/л	2,4	4,1
АсАТ ммоль/л	1,3	2,6
ПТИ %	80,4	75,6
Альбумины %	41,4	33,6
Г-глобулины %	20,2	24,1
ЩФ. ммоль/л	6,1	6,5
Тимоловая проба ед.	3,4	4,3

В 75 % случаев дети жаловались на тошноту, боли в животе. Желтуха была у 25 % детей. Увеличение печени мы отмечали у всех детей, причем она выступала не более чем на 2см, у половины – от 2 до 5см и у 50% более чем на 5см из-под реберной дуги. У 75 % детей пальпировалась селезенка: у 25% она выступала из-под реберной дуги не более чем на 1см, а у 75 % - на 1-3см. У половины детей селезенка была очень плотной.

У 75 % детей имелись множественные телеангиэктазии на лице, кистях, у всех обследованных – пальмарная эритема. У 100 % детей 2 группы диагностировался геморрагический синдром. У 2 детей были эпизодические носовые кровотечения, у 2 проявления геморрагического синдрома сводились к синякам на конечностях.

Из биохимических показателей, отмечалась гиперферментемия: средние значения АЛАТ и АсАТ были выше контрольных показателей соответственно в 12 и 16 раз. Обращала на себя внимание диспротеинемия за счет увеличения γ -глобулиновой фракции сыворотки крови, снижения содержания альбуминов. Показатели щелочной фосфатазы были повышены, как и показатели тимоловой пробы. ПТИ достоверно снижался.

У двух больных с С-генотипом был ХВГВ низкой активности. Один из них жаловался на быструю утомляемость после физической нагрузки, на плохой аппетит. При осмотре у обоих была констатирована гепатомегалия – печень была увеличена на 1,5см. Данные биохимических исследований были следующими: билирубин общий – 12,4 мкмоль/л, билирубин конъюгированный – 3,1 мкмоль/л, АЛАТ -1,1 ммоль/л, АсАТ -0,93 ммоль/л, альбумины – 45,4%, γ -глобулины-16,8%, щелочная фосфатаза – 5,2 ммоль/л, тимоловая проба-3,8 ед, ПТИ-88 %.

У детей данной группы определялся HBsAg, HBeAg, ДНК HBV.

Приводим клинический пример течения ХВГВ у детей с С-генотипом.

Юрий Л., 10 лет (ист.б-ни 393) поступил в клинику 5.03.08. с жалобами на слабость, отсутствие аппетита, тошноту, рвоту. Заболевание началось в 2004 году, когда при посещении участкового педиатра по поводу ОРВИ было

диагностировано увеличение печени. Сданный на ферменты анализ крови показал значения выше показателей нормы. Пройдя обследование в стационаре, ему был поставлен диагноз хронический ВГВ. После выписки из стационара ребенок периодически жаловался на боли в животе, становился вялым, пассивным. При осмотре сознание ясное, вялый, заторможен. Температура тела нормальная, зев без изменений. Со стороны легких и сердечно-сосудистой системы отклонения не выявлены. Пульс 75 ударов в минуту. Печень выступает из-под реберной дуги на 3,0-5,0см. Селезенка не пальпируется. Данные биохимических исследований: общий билирубин-14,6 мкмоль/л, АЛАТ-1,8 ммоль/л, АсАТ-1,0 ммоль/л, альбумины-36%, γ -глобулины-16%, щелочная фосфатаза-7,1 ммоль/л, тимоловая проба-4,8 ед., ПТИ-88%. Общий анализ крови: гемоглобин-130 г/л, эрит.- $4,1 \times 10^{12}$ /л, лейкоц.- $6,6 \times 10^9$ /л, эозин-0%, палоч.-2%, сегм.-35%, лимф.-45 %, СОЭ-4 мм/ч. Выявлены следующие серологические маркеры: HBsAg, HBeAg, анти-HBc(сум), ДНК-HBV, выявленный генотип - С. УЗИ: печень увеличена за счет правой доли на 3см. Контуры четкие, ровные, поверхность гладкая. Паренхима уплотнена диффузно с повышенной эхогенностью. Установлен диагноз: хронический вирусный гепатит В, стадия репликации, умеренной активности.

Проиллюстрированный пример показывает, что в данном случае при наличии у больного клинических проявлений гепатита, изменений со стороны печеночно-клеточных ферментов, выявление серологических маркеров, позволило подтвердить диагноз, установить генотип HBV и стадию ХВГВ.

Для выявления клинико-биохимических особенностей ХВГВ с учетом генотипов, нами проведено сопоставление клинических симптомов и биохимических показателей детей с генотипами Д, А, С. Полученные данные представлены в таблице 3.3.2.

Сравнительный анализ показал, что симптомы интоксикации чаще встречались у детей с С-генотипом, чем у детей с Д-генотипом и А-

генотипом. На плохой аппетит чаще жаловались дети с С-генотипом, чем дети с Д-генотипом и А-генотипом. Таких симптомов, как тошнота, боли в животе, желтуха у детей с А-генотипом не встречались, а у детей с Д- и С-генотипами частота их встречаемости достоверно не отличалась. Гепатомегалия отмечалась у большинства детей с Д- и А-генотипами и у всех детей с С-генотипом.

Чаще у детей с А-генотипом печень была увеличена до 2см, в сравнении с детьми с Д-генотипом и С-генотипом. У них же печень реже выступала из-под реберной дуги на 2-5см.

Таблица-3.3.2

Биохимические показатели в периоде обострения ХВГВ у детей с различными генотипами HBV.

Биохимичес. показатели	Выявленные генотипы		
	Д (n-21)	А (n-5)	С (n-4)
Билир.общий мкмоль/л	16,91	13,1	16,3
Билир.конъюг мкмоль/л	5,5	3,7	4,4
АлАТ, ммоль/л	1,4	0,73	2,8
АсАТ, ммоль/л	0,78	0,35	1,74
ПТИ %	85,6	89,9	81,7
Альбумины %	44,6	48,4	38,9
Г-глобулины %	17,8	15,3	21,2
ЩФ ммоль/л	5,3	3,97	6,1
Тимол.проба	3,3	2,7	3,7

Более чем на 5см печень выступала у детей с Д- и С-генотипами в равной степени. У детей с С-генотипом чаще встречались спленомегалия в сравнении с детьми с А-генотипом. Внепеченочные знаки, такие как телеангиэктазии и

пальмарная эритема, чаще встречались у детей с С-генотипом в сравнении с детьми с Д- и А- генотипами

Их биохимических показателей, у детей с С-генотипом достоверно выше были средние значения АлАТ и АсАТ, чем у детей с Д-генотипом и А-генотипом.

Следовательно, тяжелее заболевание протекало у детей с С-генотипом: они чаще жаловались на слабость утомляемость, плохой аппетит, у них была более выражена гепатомегалия, спленомегалия, чаще встречались непеченочные знаки, достоверно выше были средние показатели АлАТ и АсАТ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ВГВ – остается одной из самых актуальных проблем здравоохранения во всем мире в связи с его повсеместным распространением, высокой социальной, эпидемической, экологической значимостью [2, 8, 11, 21, 24, 37]. Особенности ВГВ на современном этапе является неуклонный рост заболеваемости как острыми, так и хроническими формами, изменение структуры, путей передачи, формирование латентной инфекции и, связанные с этим, трудности ее диагностики [2, 11, 17, 31, 83]. Внедрение молекулярно-биологических методов диагностики позволило выделить мутантные штаммы HBV, что затрудняет подтверждение вирусной этиологии гепатита при использовании только серологических методов исследования [2, 49, 58].

Одним из факторов, способствующих повсеместному сохранению ВГВ, является способность вируса ГВ существовать в нескольких биологических вариантах, называемых мутантными формами.

В последние годы изучена последовательность нуклеотидов в геноме вирусной частицы и уточнены гены, кодирующие определенные белки вируса. В той или иной зоне генома под действием различных факторов могут происходить точечные мутации. Точечная мутация возникает как результат замены, добавления или делеции нуклеотидов. Мутации могут приводить к синтезу дефектного, неактивного белка или к потере способности продуцировать ранее синтезируемые белки. Возникновение и/или отбор мутантов отражает попытки вируса противостоять иммунологической атаке хозяина и выжить. Наличие точечных мутаций отражается на серологическом профиле маркеров, не укладывающемся в обычную трактовку результатов, и на клиническом течении HBV-инфекции.

В разных географических областях обнаруживается большое разнообразие в частоте обнаружения мутаций, что объясняется преобладанием того или иного генотипа ВГВ на изучаемой территории. Генотип вируса – его характеристика с позиций геномных последовательностей. В настоящее время описаны 9 генотипов вируса,

которые имеют характерное географическое распространение, специфическое влияние на клиническое течение инфекции, ее прогноз.

В патогенезе поражения органов, обусловленного HBV инфекцией основополагающую роль играет взаимозависимость вируса и макроорганизма. Возникновение мутантов отражает попытки вируса избежать представляющих угрозу для его существования и выживания во враждебной среде механизмов. Ответ же на инфицирование со стороны макроорганизма определяют ряд его факторов. К таким факторам относится система ИФН, которая является важнейшим фактором неспецифической резистентности, обеспечивающим противовирусную защиту клеток. Влияние системы ИФН на различные звенья гомеостаза, неоднородность ИФН, диктует необходимость оценки состояния системы по сумме параметров - интерфероновому статусу.

Терапия ВГВ у детей была и остается предметом многочисленных исследований в различных странах мира [31, 62, 83]. Конечными целями терапии являются стабильное подавление репликации HBV и клиническая ремиссия процесса. В настоящее время только ИФН- α и ламивудин доказали свою эффективность и рекомендацию для лечения ВГВ. Однако главной проблемой терапии ИФН- α при гепатите у детей является сложности при парентеральном его применении, многочисленные побочные эффекты, невозможность назначения детям до 3 лет. Все указанные проблемы возможно избежать при применении виферона. Преимуществом виферона являлась его безопасность, отсутствие побочных эффектов и возможность применения у детей раннего возраста. Ректальный способ введения упростил его применение у детей. Однако, при применении виферона для лечения гепатита, вызванного мутантным штаммом, отмечается высокая частота рецидивов после окончания лечения, что ограничивает его применение у данной группы больных. Это привело к необходимости поиска новых подходов к терапии ВГВ. Особый интерес представляют результаты терапии синтетическими нуклеозидами, в частности ламивудином.

В Республике Узбекистан исследования по частоте распространения мутантов не проводились, не изучался спектр и выраженность клинических проявлений, особенности серологического профиля, исходы заболевания, вызванного различными генотипами HBV и мутантным штаммом вируса. Сообщений о состоянии системы ИФН, также сообщений о применении виферона, ламивудина у детей с ВГВ, инфицированных различными генотипами вируса, в анализируемой литературе мы не встретили.

Учитывая вышеизложенное, нами была поставлена цель: выявить клиничко-биохимические, иммунологические особенности ВГВ у детей с различными генотипами.

Для выполнения поставленной цели за период с 2008 по 2010 год было обследовано 30 детей с ХВГВ. Исследования больных включали: клинический анализ, биохимические, серологические, иммунологические исследования, оценку ИФС.

Нами обследовано 30 детей с ХВГВ. Среди детей, находившихся под наблюдением, мальчиков было в 2,5 раза больше, чем девочек. Наблюдаемых детей была в возрасте от 10 до 14 лет.

Маркеры дельта – инфекции у обследованных детей не были выявлены. У 70% детей ХВГВ развился в исходе острой манифестной HBV-инфекции, у 30% имел место первично-хронический ВГВ без начальной манифестации.

Исследования по выявлению генотипов HBV у обследованных детей показало, что преобладающим является D-генотип. Он встречался у 70% детей. Встречался также A-генотип у 16,7% и C-генотип – у 13,3% детей. D-генотип был выявлен у детей различных популяций, но больше у представителей узбекской (70% против, у корейской 10% и у 20% русской). A-генотип также встречался у детей всех популяций: чаще у русской – в 55% случаев, у корейской 15% а у узбекской в 30% случаев. C-генотип встречался только у детей корейской популяции.

С учетом активности процесса, согласно критериям, принятым международным совещанием гепатологов, было выявлено, что тяжелее

заболевание протекает у детей с С-генотипом, в сравнении с А- и Д-генотипами и легче у детей с А-генотипом, в сравнении с Д- и С-генотипами. О более тяжелом течении ВГВ, вызванным С-генотипом сообщали ряд авторов [37, 43].

У детей с минимальной активностью ХВГВ отмечается незначительная астения, некоторое ухудшение аппетита, умеренное увеличение печени. Селезенка у большинства больных не увеличена. Синдром желтухи отсутствует, внепеченочные проявления наблюдаются в единичных случаях. Повышается активность АЛАТ и АсАТ. У больных с низкой активностью ХВГВ отмечается умеренно выраженная интоксикация, ухудшение аппетита, болевой абдоминальный синдром, увеличение печени, селезенки. Внепеченочные проявления регистрируются в единичных случаях. Отмечается повышение активности АЛАТ и АсАТ. У больных с умеренной степенью активности воспалительного процесса состояние чаще нарушено – отмечается вялость, ухудшение аппетита, боли в животе, увеличение печени более чем на 5 см, селезенки. Регистрируются внепеченочные проявления, в единичных случаях - геморрагический синдром. Из биохимических показателей наблюдается гипербилирубинемия, гиперферментемия, повышение показателей щелочной фосфатазы, тимоловой пробы, диспротеинемия. У больных с выраженной степенью активности процесса отмечается стойко сохраняющаяся астения, быстрая утомляемость, вялость, снижение аппетита, боли в животе, увеличение печени, селезенки. У больных выявляется субиктеричность склер, внепеченочные знаки в виде телеангиэктазий и яркой пальмарной эритемы. Геморрагический синдром проявляется носовыми кровотечениями, легко возникающими синяками. Кроме этого, наблюдается гипербилирубинемия, гиперферментемия, диспротеинемия.

С учетом активности процесса тяжелее заболевание протекало у детей с С-генотипом, в сравнении с Д- и А-генотипами и легче у детей с А-генотипом, в сравнении с Д- и С-генотипом. Дети с С-генотипом чаще

жаловались на слабость утомляемость, плохой аппетит, у них была более выражена гепатомегалия, спелномегалия, чаще встречались внепеченочные знаки, достоверно выше были средние показатели АлАТ и АсАТ. На более высокие показатели трансаминаз при заражении С-генотипом указывал Chan H.L et al.[68].

При серологическом обследовании детей с ХВГВ выявлена группа – 6 ребенка (20 %) – которая отличалась отсутствием НВеАг в сыворотке крови и наличием анти-НВе. У всех детей данной группы выявлялась ДНК НВV, что говорит о происходящей вирусной репликации при наличии анти-НВе. Причиной этого является инфицирование НВеАг-негативным пре-соре-мутантом НВV. По данным Г.И. Сторожакова и др.[41], в структуре ВГВ доля заболеваний, ассоциированных с пре-соре мутантом составляет 7-30%. Они часто встречаются в странах Азии и Средиземноморья [14, 20, 70].

У всех детей с «НВеАг-минус» гепатитом был Д-генотип. На частую встречаемость пре-соре мутантов у больных с Д-генотипом указывали ряд исследователей [58].

Гепатит, вызванный мутантным штаммом одинаково часто встречался как у девочек, так и у мальчиков.

Для детей с «НВеАг-минус» гепатитом характерна минимальная и низкая активность, так как иммунный ответ на мутантный штамм выражен незначительно и активность некротически-воспалительных процессов в ткани печени невысока, что согласуется с данными ряда авторов [34, 36]. Для детей с «НВеАг-минус» гепатитом характерна скудность клинических проявлений, у них достоверно ниже были средние значения АлАТ и АсАТ, относительно показателей детей с гепатитом, вызванным диким штаммом.

Выраженность и характер инфекционного процесса при ВГВ в значительной степени обусловлен особенностями иммунного ответа. Наши исследования были направлены на выявление особенностей иммунореактивности у больных ВГВ с различными генотипами НВV для уточнения патогенеза и выявления имеющих особенностей.

ВЫВОДЫ.

1. У 21 (70%) детей с ХВГВ обнаруживается Д-генотип. А-генотип регистрируется у 5 (16,7%) детей, С-генотип – у 4 (13,3%) детей. Генотипы В, F не обнаруживаются ни у одного пациента. Д-генотип регистрируется у детей всех национальностей, но чаще у детей узбекской национальности. А-генотип встречается у детей всех национальностей, но чаще у русских, а С-генотип – у детей только корейской национальности.
2. ХВГВ тяжелее протекает у детей с С-генотипом: они чаще жалуются на слабость, плохой аппетит, утомляемость, у них более выражена гепатомегалия, спленомегалия, чаще встречаются внепеченочные знаки, выше средние показатели АлАТ и АсАТ.
3. У 20 % детей с ХВГВ наблюдается атипичный серологический фон, причиной которого явилось инфицирование НВеАg-негативным пресоре-мутантом НВV. Гепатит, вызванный мутантным штаммом, одинаково часто встречается как у мальчиков, так и у девочек. В 70 % случаев он возникает как первично-хронический без начальной манифестации. Для него характерна минимальная и низкая активность процесса, скудность клинических проявлений при продолжающейся репликации вируса.
4. Выраженность выявленных изменений была различной в зависимости от генотипа НВV. Более глубокие и длительные нарушения в основных звеньях иммунитета отмечены у детей с Д-генотипом и С-генотипом при хроническом течении заболевания и у детей с С-генотипом при ХВГВ. Для детей с «НВеАg-минус» гепатитом характерна незначительная выраженность изменений и меньшая их продолжительность.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Диагностическое обследование детей должно включать расшифровку генотипа HBV, так как знание особенностей клиники, течения ВГВ в зависимости от генотипов позволит индивидуализировать тактику лечения больных.

2. У больных с ХВГВ необходимо выявление молекулярно-генетических маркеров HBV. Определение генотипа может служить дополнительным критерием прогноза клинического течения и исхода заболевания.

ПУБЛИКАЦИИ.

1.Гаджиев Б.М, Тураходжаева Н.М. «Генотипические особенности хронического гепатита В у детей». VIII научно практическая конференция резидентов магистратуры и клинических ординаторов ТашПМИ, посвященной году «Гармонично развитое поколение» Ташкент 5.05.2010. стр. 123-124 .

2.Гаджиев Б.М, Тураходжаева Н.М. «Клиническая характеристика и прогноз хронического гепатита В от зависимости генотипа вируса» VIII научно практическая конференция резидентов магистратуры и клинических ординаторов ТашПМИ, посвященной году «Гармонично развитое поколение» Ташкент 5.05.2010. стр. 124-125.

3.Закирходжаев А.Х., Тураходжаева Н.М. и соав. «Амебиаз» методическая рекомендация для практических врачей. Ташкент 6.01.2010.

4.Закирходжаев А.Х., Тураходжаева Н.М. и соав. «Ўткир респиратор вирусли касалликлар» методическая рекомендация для практических врачей. Ташкент 10.03.2010.

ЛИТЕРАТУРА

1. Апросина З.Г., Серов В.В. //Хронические заболевания печени: пато-и морфогенез, клиническая характеристика / Тер. архив.-1995.-Т.67.- №5.-С.77-79.
2. Бондаренко А.Л. //Роль иммунореактивности в формировании затяжного течения вирусного гепатита В / Эпидем. и инфекц. болезни.- 1998.-№3.-С.42-46.
3. Вирусный гепатит В: достижения и проблемы / Рос. педиатр. журн. – 1998.- №1.- С.50-60.
4. Горбаков В.В. //Современные подходы к лечению хронических вирусных заболеваний печени / Тер. архив.- 2000.-№8.-С.5-9.
5. Даминов Т.А. //Достижения ученых Узбекистана в решении актуальных проблем диагностики и лечения вирусных гепатитов В и С у детей / Ozbekiston tibbiyot Jurnalı.-2003.-№6.-С.18-24.
6. Жданов В.М., Ананьев В.А., Стаханова В.М.//Вирусные гепатиты/ Москва. Медицина, 1986. с.255.
7. Закирходжаев А.Х.// Руководства по инфекционным болезням для студентов медицинских вузов, магистров, педиатров и врачей инфекционистов/ 2-3. Ташкент. 2004г.
8. Закирходжаев А.Х., Таджиев Б.М. // Вирусные гепатиты/ Ташкент. 2009г. с.130.
9. Иванова В.В., Яковлева А.А.//Клинико-лабораторные и морфологические критерии диагностики различных форм вирусного гепатита С у лиц молодого возраста/ Автореф. Санкт – Петербург 1998.
10. Иноятова Ф.И. //Хронические вирусные гепатиты у детей./ : Дис... докт. мед. наук- Ташкент.-1999.- 341 с.
11. Инфекционная заболеваемость в Российской Федерации в 2000-2001 гг.: Инф. Сб. стат.и анализ. материалов.-М.- 2002.- 6с.

- 12.Кадыров Б.А., Сабирова Ф.Б. //Особенности течения хронических гепатитов с высокой активностью в зависимости от маркерного профиля HBV и HDV- инфекции у детей / Педиатрия.-2000.-№4.-С.45-48.
- 13.Корочкина О.В., Неумоина М.В. //Особенности иммуногенеза острого и хронического форм гепатита В/ Рос. журн. гастроэнтер. гепатол, колопрокт.-1995.-Т.5.-№3.-121с.
- 14.Котович М.М. //Особенности течения хронического гепатита В у детей на фоне противовирусной терапии / Вопр. совр. педиатрии.-2003.-Т.2.-№4.-С.7-12.
- 15.Крель П.Е. //Клиническое значение полимеразной цепной реакции при лечении хронических гепатитах В и С/ Рос. журн. гастроэнтер. гепатол. колопрокт.-1998.-№5.- С.45-47.
- 16.Кузин С.Н. //Сравнительная эпидемиологическая характеристика гепатитов С парентеральным механизмом передачи возбудителей в России и некоторых странах СНГ/ Дис... д-ра. мед. наук.-М.- 1998.- 356 с.
- 17.Майер К.П. //Гепатит и последствия гепатита./ -М.-2000.-424с.
- 18.Мирзаев К.М., Юльчибаев М.Р., Абдуразаков А.А. //Этиологическая структура острых вирусных гепатитов у детей/ Мед. журн. Узбекистана.-2000.-№1-2.-С.26-28.
- 19.Неумоина М.В., Мешкова Е.Н., Соринсон С.Н. //Алгоритм прогнозирования трансформации острого гепатита В в хронический/ Человек и лекарство.-М.-1985.- 311 с.
- 20.Рейзис А.Р., Нурмухаметова Е.А., Шипулина О.Ю. //Новое в противовирусной терапии хронического гепатита В у детей./ Эпидем. и инфекц. болезни.- 2001.-№4.-С.28-31.
- 21.Сологуб Т.В., Арипенко Р.Ю., Новицкий Г.К. //Новые направления в гепатологии./ Тез.докл. Фальк. Симпозиума №92.- СПб.- С.87.

- 22.Сторожаков Г.И., Никитин И.Г. //Хронические вирусные заболевания печени – системные инфекции?/ Тер. архив.- 1998.- №2.- С.80-82.
- 23.Сторожаков Г.И., Никитин И.Г., Поляков А.Н. //Хронический гепатит, ассоциированный с вирусом гепатита В с наличием мутации в пресоре области : клиника и подходы к терапии/ Клин.фарм. и терапия.- 2000.- №9(1).- С.45-48.
- 24.Учайкин В.Ф. //Вирусные гепатиты у детей : Этиологическая структура, особенности течения и лечения/ Эпидемиол.и инфекц. болезни.- 1998.- №2.-С.4-8.
- 25.Учайкин В.Ф., Чередниченко Т.В., Писарев А.Г. //Оценка течения хронического гепатита у детей/ Росс.журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии – 2000.- №2.- С.48-53
- 26.Ходжаев Ш. //Итоги и перспектива изучения закономерностей эпидемиологического и инфекционного процессов при вирусных инфекциях в Узбекистане./ Журн.теоретич.и клин. медицины.-1999.- №1.-С.14-16.
- 27.Шахгильдян И.В. //Современные особенности эпидемиологии гепатитов В и С в Российской Федерации/ Гепатит В,С и Д – проблемы диагностики, лечения и профилактики М.- 2001.-С.387-384.
- 28.Шахгильдян И.В., Михайлов М.И. //Значение вакцинации подростков в снижении заболеваемости гепатитом В в России/ Детский доктор.- 2000.-№4.-С.5-6.
- 29.Якушева Е.Е. //Клинико-лабораторная оценка применения альфа-2 рекомбинантного интерферона у детей больных вирусными гепатитами В и С/ Автореф. дис. ... к.м.н.- М.-1999.- 20 с.
- 30.Akarca U.S., Green S., Lok A.S. //Detection of precore hepatitis B virus mutants in asymptomatic HBs Ag- positive family members/ Hepatology.- 1994.-19.-S. 1366-70.
- 31.Akarca U.S., Lok A.S. //Naturally occurring hepatitis B virus core gene mutations/ Hepatology.-1995.-22.-S.50-60.

32. Allen M., Deslariers M. //Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine/ *Hepatology*.-1998.-27.-S.1670-1677.
33. Arbuthnot P., Capovilla A., Kew M. //Putative role of hepatitis B virus X protein in hepatocarcinogenesis: effects on apoptosis, DNA repair, mitogen-activated protein kinase and TAK ... STAT path ways/ *J. Gastroenterol Hepatol*.-2000.-15.-S.357-68.
53. Aye T.T., Uchida T., Becker S.O. //Variations of hepatitis B virus precore/core gene sequence in acute and fulminant hepatitis B/ *Dig Dis Sci*.-1994.-39.-S.1281-7.
54. Bancroft W.H., Mundon F.K., Russell P.K. //Detection of additional antigenic determinant of hepatitis B antigen/ *J. of Immunology*.-1972.-109.-S.842-848.
55. Bartholomew M.M., Tansen R.W., Tejlers L.T. //Hepatitis B- virus resistance to lamivudine given for recurrent injection after or thotopic liver transplantation/ *Lancet*.-1997.-349.-S.20-22.
56. Bertoletti A., Ferrari C., Fiaccadori F. //HLA class I-resisted human cytotoxic T cells recognize endogenously synthesized hepatitis B virus nucleocapsid antigen/ *Proc Natl Acad Sci USA*.-1991.-N88.-P 10445-9.
57. Bertoletti A., Sette A., Chisari F.V. //Natural variants of cytotoxic epitopes are T-cell receptoor antagonists for antiviral cytotoxic T cells/ *Nature*.-1994.-369.-407-10.
58. Borchani-Chabchoub I., Gargouri A., Mokdad- Gargouri R. //Genotyping of Tunisian hepatitis B virus isolated based on the sequencing of pre S₂ and S regions/ *Microbes and Infection*.-2000.-2.-607-612.
59. Brunetto M.R., Giarin M.M., Ooliveri F. //Wild type and e-antigen-minus hepatitis B viruses and course of chronic hepatitis/ *Proc Natl Acad Sci USA*.-1991.-88.-P.4186-90.

60. Brunetto M.R., Giarin M.M., Saracco G. //Hepatitis B virus unable to secrete e antigen and response to interferon in chronic hepatitis B/ Gastroenterology.-1993.-105.-845-850.
61. Brunetto M.R., Stemler M., Bonino F. //A new hepatitis B virus strain in patients with severe anti-HBe positive Chronic hepatitis B/ J.Hepatol.-1990.-10.-258-61.
62. Carman W, Thomas H, Domingo E. //Viral genetic variation: hepatitis B virus as a clinical example./ Lancet 1993;341:349–53.
63. Carman W., Sangfelt P, Norder H. //Interferon-alpha 2b treatment in hepatitis B carriers. Effect on hepatitis B virus DNA levels in children infected with different genotypes/ J Viral Hepatitis. 1997; 4(1):1-8.
64. Carman W.F. //The clinical significance of surface antigen variants of hepatitis B virus/ J. Viral Hepatitis.-1997.-4.-P.11-20.
65. Carman W.F., Jacyna M.R., Hadziyannis S. //Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection /Lancet.-1989.-2.-P.588-91.
66. Carman W.F., Van Deursen F.J., Mimms L.T. //The prevalence of surface antigen variants of hepatitis B virus in Papua New Guinea, South Africa, and Sardinia/ Hepatology.-1997.-26.-1658-66.
67. Cshalm S.W., Heathcote J., Cianciaza J. //Lamivudine and alpha interferon treatment of patients with chronic hepatitis B infection: a randomised trial /Gut.-2000.-46(4).- S .562-568.
68. Chan H.L., Hussain M., Lok A.S. //Different hepatitis B virus genotypes are associated with different mutations in the core promoter and precore regions during hepatitis B e antigen seroconversion/ Hepatology.-1999.-29.-976-984.
69. Chisari F.V., Ferrari C. //Hepatitis B virus immunopathology/ Springer Semin Immunopathol.-1995.-17.-261-81.
70. Chu C.J., Lok A.S. //Clinical significance of hepatitis B virus genotypes/ Hepatology.-2002.-35.-1274-1276.

71. Conjeevaram H.S., Lok A.S. //Management of chronic hepatitis B/ J of Hepatology.-2003.-38.-90-103.
72. Courouce - Pauty A.M., Plancon A., Soulier J.P. //Distribution of HBs Ag subtypes in the world/ VOS Sanquinis.-1983.-44.-197-211.
73. Da Villa G., Sepe A. //Pilot project of anti-HBs universal vaccination of newborns in a hyperendemic area: results after 17 years/ Antiviral Ther.-2000.-5.-P.770-4.
74. Davis G.D. //Hepatitis B : diagnosis and treatment/ South Med J.-1997.-90.-866-70.
75. Deinstag J., Schiff E., Wright T. //Lamivudine treatment for one year in previously untreated US hepatitis B patients : histologic improvement and hepatitis B e-antigen (HbeAg) seroconversion/ Gastroenterology.-1998.-114(4).-1235.
76. Devis G., Hoofnagle J. //Interferon in viral hepatitis: role in pathogenesis and treatment/ Hepatology.-1986.-6.1038-1041.
77. Dienstag J.L., Wright T.L. //Lamivudine (zeffix) as Initial Treatment for chronic hepatitis B/ J.Med.Virol.-2000.-54(2).-257-264.
78. Ding X., Mizo Kami M., Ge X. //Different hepatitis B virus genotype distribution among asymptomatic carriers and patients with liver diseases in Nanning, southern China/ Hepatol.Res.-2002.-22.-37-44.
79. Doo E., Liang T.J. //Molecular anatomy and pathophysiologic of drug resistant in hepatitis B virus infection/ Gastroenterology.-2001.-120(4).-1000-8.
80. Kao J.H. // Hepatitis B viral genotypes: clinical relevance and molecular characteristics/ J. Gastroenterol Hepatol. -2002.-17(6).-s 643-50.
81. Fattovich G., Brollo L., Giustina G. //Natural history and prognostic factors for chronic hepatitis B/ Gut.-1991.-32-3.- P.294-298.
82. Fattovich G., Mc Intyre G. Thursz M. //Hepatitis B precore core variation and interferon therapy/ Hepatology.-1995.-22.-1355-1362.

83. Feitelson M., Lega L., Guo J. // Pathogenesis posttransfusion viral hepatitis in children with B-thalassemia / *Hepatology*.-1994.-19.-P.558-68.
84. Feitelson M.A., // Biology disease. Biology of hepatitis B virus variants/ *Lab Invest*.-1994.-71.-P.324-49.
85. Feitelson M.A., Duan L.X., Guo J. // Precore and X Region mutants in hepatitis B virus infection among renal dialysis patients/ *J. Viral Hepatitis*.-1995.-22.-19-31.
86. Feld J., Locarnini S. // Antiviral therapy for hepatitis B virus infections : new targets and technical challenges/ *J. Clin Viral*.-2002.-25.-267-283.
87. Ferro A., Mbayed V.A., Lopez J.L., Telenta P.F // Distribution of hepatitis B virus genotypes in two different pediatric populations from Argentina/ *J. of Clinical Microbiology*.-1998.-36.- S .3362-3365.

