

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИММУНОКОРРЕКЦИИ ХРОНИЧЕСКОГО ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА С НА ФОНЕ ПРОТИВОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ

Л.Ф. Скляр, Е.В. Маркелова, И.С. Горелова

ГБОУ ВПО Владивостокский государственный медицинский университет МЗ РФ

Резюме. Противовирусная терапия при хроническом вирусном гепатите С должна осуществляться с проведением иммунореабилитационных мероприятий, направленных, в первую очередь, на стимуляцию клеточного звена иммунной системы и процессы элиминации циркулирующих иммунных комплексов. В данной работе изучалась динамика концентраций молекулярных фракций циркулирующих иммунных комплексов и содержания иммуноглобулинов, а также проводилась оценка показателей фагоцитоза на фоне комплексного лечения хронического вирусного гепатита С, включающего в себя стандартную противовирусную терапию в составе пегилированных интерферонов в сочетании с рибавирином и иммунокорректирующую — ронколейкином. Применение ронколейкина в комбинации с противовирусной терапией хронического вирусного гепатита С определяет возможность оптимизации существующих протоколов лечения.

Ключевые слова: хронический вирусный гепатит С, противовирусная терапия, иммунореабилитация.

EFFICIENCY OF IMMUNOCORRECTION IN CHRONIC VIRAL HEPATITIS C PATIENTS TREATED BY ANTIVIRALS

Sklyar L.P., Markelova E.V., Gorelova I.S.

Abstract. Chronic hepatitis C antiviral therapy should be followed by immune rehabilitation measures directed to T-cell immunity stimulation and elimination of circulating immune complexes. The dynamics of concentrations of molecular fractions of circulating immune complexes and immunoglobulins has been studied. Moreover, phagocytosis indices were evaluated during combined antiviral therapy by standard PEG-interferon and ribavirin and immune correction drug Ronkoleukin. Application of Ronkoleukin in combination with antiviral therapy determines possibilities to optimize existing treatment protocols of chronic hepatitis C. (*Infekc. immun.*, 2013, vol. 3, N 1, p. 59–64)

Key words: chronic viral hepatitis C, antiviral therapy, immune rehabilitation.

Введение

Хроническая вирусная инфекция характеризуется постоянным наличием антигена в организме, что, соответственно, приводит к повышению образования циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК). Снижение реактивности клеточного звена адаптивного иммунитета может совпадать с понижением функциональной активности фагоцити-

рующих клеток, что, в свою очередь, также ведет к увеличению уровня ЦИК [8, 11]. Известно, что макрофаги и нейтрофильные гранулоциты являются ключевыми клетками, участвующими в утилизации иммунных комплексов из периферической крови [1, 11]. При Т-клеточном иммунодефиците дополнительная антигенная нагрузка может привести к активации антиген-неспецифических механизмов иммунитета (например, связанных

поступила в редакцию 01.12.2012
принята к печати 19.02.2013

© Скляр Л.Ф., Маркелова Е.В.,
Горелова И.С., 2013

Адрес для переписки:

Скляр Лидия Федоровна,
д.м.н., профессор кафедры инфекционных
болезней и патологической физиологии
ГБОУ ВПО ВГМУ

690105, г. Владивосток, ул. Русская, 74Б-18,
ГБОУ ВПО ВГМУ.
Тел.: 8 914 791-65-76 (моб.).
E-mail: lidia.sklyar@hotmail.com

с двойными негативными лимфоцитами), что малоэффективно для элиминации антигенов и, с другой стороны, является основой формирования аутоиммунных реакций и лимфо-пролиферативных заболеваний [1, 2]. У пациентов с хроническими вирусными гепатитами (ХВГ) вторичная иммунная недостаточность характеризуется снижением относительного и абсолютного уровня CD3⁺, CD4⁺ и CD8⁺ клеток. При этом количество В-лимфоцитов компенсаторно повышается. Повышение содержания В-клеток сопровождается усилением их функциональной активности с гиперпродукцией иммуноглобулинов и ЦИК, что подтверждает их важную роль в иммунопатологических процессах при ХВГ независимо от этиологического фактора [4, 10, 14]. При выборе лечебной тактики необходимо учитывать размер ЦИК. Так, при наличии в циркуляции крупных ЦИК необходима стимуляция фагоцитоза для их удаления. При преобладании мелких и средних патогенных ЦИК необходимы мероприятия по их укрупнению (УФ-облучение крови, плазмаферез и т.п.) с последующим стимулированием систем, ответственных за клиренс ЦИК.

Известно, что в запуске и координации адаптивных механизмов иммунореактивности решающее значение имеют цитокины, в частности, интерлейкин-2 (IL-2) [5, 12]. Дефицит эндогенного IL-2 может приводить к нарушениям в клеточной системе иммунитета, а также влиять на эффективность работы компонентов врожденного иммунитета [5, 6]. Восстановление Т-клеточного пула и нормального функционирования системы иммунореактивности в этих условиях возможно только при проведении иммунозаместительной терапии экзогенным IL-2. Включение рекомбинантного IL-2 (ронколейкина) в противовирусную терапию (ПВТ) хронического вирусного гепатита С (ХВГС) будет способствовать восстановлению иммунореактивности с последующим развитием каскада клеточно-опосредованных реакций иммунного ответа, что, возможно, приведет к снижению числа рецидивов и предотвращению прогрессирования хронического процесса с исходом в цирроз печени [9, 10, 13]. Следовательно, ПВТ при ХВГС должна осуществляться с проведением иммунореабилитационных мероприятий, направленных, в первую очередь, на стимуляцию клеточного звена иммунной системы и процессы элиминации ЦИК.

Все вышеперечисленное является патогенетическим обоснованием для включения в программу комплексной терапии ХВГС

ронколейкина. Препарат ронколейкин — рекомбинантный интерлейкин-2 человека — является одним из лекарственных средств, используемых при проведении цитокинотерапии. Ронколейкин для инъекций (Roncoleukin, регистрационное удостоверение № 000 122/01-2000) — лекарственная форма рекомбинантного интерлейкина-2 человека (rIL-2), выделенного и очищенного из клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, в генетический аппарат которых встроен ген человеческого IL-2. Рекомбинантный интерлейкин-2 человека (rIL-2) — белок с молекулярной массой 15 300±200 Da, структурный и функциональный аналог эндогенного IL-2. Ронколейкин выпускают в ампулах в дозах по 1 мг (1 000 000 МЕ), 0,5 мг (500 000 МЕ) и 0,25 мг (250 000 МЕ) действующего начала rIL-2. Цитокиновые препараты обладают замещающими и регуляторными эффектами, а способность ронколейкина клонально активировать Т- и В-составляющие адаптивного иммунитета позволяет констатировать наличие у него свойств, характерных для средств активной иммунотерапии. В организме ронколейкин и подобные ему цитокиновые препараты являются средствами как замещающего (восполняющего), так и индуктивного типа действия.

Целью настоящего исследования являлось изучение динамики концентраций молекулярных фракций ЦИК и содержания иммуноглобулинов, а также оценка показателей фагоцитоза на фоне комплексного лечения ХВГС, включающего в себя стандартную ПВТ (пегилированные интерфероны в сочетании с рибавирином) и иммунокорректирующую (ронколейкин).

Материалы и методы

Проведено комплексное клинико-лабораторное и инструментальное обследование 41 пациента (21 женщина и 20 мужчин) с ХВГС. Основную группу составили 19 больных, которым проводили ПВТ с ронколейкином. В группе сравнения находились пациенты (22 человека) только с ПВТ без включения ронколейкина. Группы были сопоставимы по возрасту, полу, длительности хронического заболевания и компонентам ПВТ (Пегинтерферон-α2 и рибавирин). Ронколейкин в основной группе вводили по 500 000 ЕД подкожно в плечо два раза в неделю одновременно с ПВТ курсом 8 недель (два месяца). Курсовая доза составила 16 инъекций.

Все пациенты находились в периоде репликативной вирусной активности, установленной методом ПЦР (АмплиСенс мони-

тор FRT, аналитическая чувствительность 300 МЕ/мл), и обследованы в соответствии с общепринятым стандартом, включая биохимические и вирусологические тесты, инструментальное обследование в виде УЗИ гепатобилиарного тракта и эластометрии печени и/или биопсии.

Концентрацию ЦИК в сыворотке крови определяли методом селективной преципитации в полиэтиленгликоле (в модификации Ю.А. Граневич). Размер ЦИК оценивали по коэффициенту $K = C_1/C_2$, где C_1 и C_2 — концентрации иммунных комплексов в сыворотке пациента, выделенные соответственно при преципитации 4 и 3% ПЭГ. Для определения размеров ЦИК были приняты следующие критерии: комплексы считали крупными при $1 < K < 1,1$, средними — при $1,1 < K < 1,5$, мелкими — при $K > 1,5$. Содержание иммуноглобулинов классов А, М, G в сыворотке крови измеряли методом турбодиметрии на автоматическом анализаторе белков «Turbox» (Финляндия). Для оценки состояния фагоцитарной защиты использовали определение в крови фагоцитарной активности нейтрофилов с помощью фагоцитарного индекса (ФИ) и фагоцитарного числа (ФЧ), а также бактерицидной активности лейкоцитов методом базального и стимулированного НСТ-теста с последующим расчетом индекса активности нейтрофилов (ИАН). В качестве контроля обследовали 14 практически здоровых добровольцев.

Результаты исследований рассчитывали, используя оценку среднего значения, его ошибки, коэффициент корреляции (r), критерий Спирмена (R) и Крускала–Уоллиса (kKW), достоверность статистических показателей (p) при помощи программы Statistica 7.0 (StatSoft Inc., 2004).

Результаты и обсуждение

До начала лечения в обеих группах обследованных пациентов отмечалось повышение количества ЦИК, в среднем в 1,7 раза по отношению к норме ($p < 0,01$), что согласуется с литературными данными большинства исследователей (табл. 1) [1, 7, 11]. Однако наличие повышенной концентрации ЦИК в сыворотке крови еще не означает их участия в патогенезе заболевания. В значительной степени это зависит от размеров образующихся иммунных комплексов, определяющих дальнейшую направленность их преобразования в организме. Это повышение имело место, главным образом, за счет увеличения количества среднемoleкулярных иммунных комплексов, содержание которых возрастало в абсолютном исчислении в 2,2 раза по отношению к соответствующему показателю нормы ($p < 0,01$). Количество мелкомoleкулярных иммунных комплексов в абсолютном исчислении возрастало в 2,2 раза, в то время как абсолютное содержание крупномoleкулярных комплексов практически не менялось. Суммарно содержание средне- и мелкомoleкулярной фракций ЦИК составляло до лечения в основной группе $320,8 \pm 44,5$ у.е., а в группе сравнения — $337,1 \pm 58,6$ у.е. при норме $158,0 \pm 26,4$ у.е. ($p < 0,01$). На 8-й неделе лечения в основной группе больных, получавших на фоне ПВТ иммуностимулирующую терапию ронколейкином, определено снижение уровня ЦИК до верхней границы нормы, уменьшение содержания в их составе наиболее патогенной среднемoleкулярной фракции (11S–19S). При этом содержание среднемoleкулярных ЦИК в основной группе снизилось с $112,7 \pm 11,3$ у.е. до $60,1 \pm 8,4$ у.е. ($p < 0,01$). В группе сравнения также имело место неко-

ТАБЛИЦА 1. КОНЦЕНТРАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ФРАКЦИЙ ЦИК ПРИ ХВГС С УЧЕТОМ СХЕМ ЛЕЧЕНИЯ ($M \pm m$)

ЦИК (у.е.оп.)	Контроль (n = 14)	Сроки обследования	Основная группа (n = 19)	Группа сравнения (n = 22)	p*
Крупные	18,5±7,8	I	22,1±6,5	25,7±6,8	> 0,1
		II	16,5±5,0	30,1±7,5	> 0,1
Средние	53,5±9,3	I	112,7±11,3	121,2±10,5	> 0,1
		II	60,1±8,4	88,8±9,7	< 0,05
Мелкие	104,5±17,1	I	208,1±33,2	215,9±48,1	> 0,1
		II	240,0±36,1	320,7±31,5	< 0,01

Примечания. I — до начала лечения, II — на 10 неделе ПВТ; * — «p» вычислен между аналогичными показателями основной группы и группы сравнения.

ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ И КОНЦЕНТРАЦИЯ ЦИК ПРИ ХВГС В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СХЕМ И СРОКОВ ЛЕЧЕНИЯ (M±m)

Показатель	Контроль (n = 14)	Основная группа (n = 19)			Группа сравнения (n = 22)		
		До лечения	На фоне ПВТ		До лечения	На фоне ПВТ	
			10 неделя	20 неделя		10 неделя	20 неделя
IgM, г/л		1,78±0,09 p < 0,001	2,09±0,11 p < 0,001 p1 > 0,05	1,3±0,14 p < 0,05 p1 < 0,001	1,80±0,08 p < 0,001	2,01±0,11 p < 0,001 p1 > 0,05 p2 > 0,05	2,01±0,24 p < 0,001 p1 > 0,05 p2 < 0,001
IgA, г/л	1,08±0,02	2,60±0,20 p < 0,001	2,60±0,30 p < 0,001 p1 > 0,05	1,08±0,09 p > 0,05 p1 < 0,001	2,90±0,20 p < 0,001	3,10±0,31 p < 0,001 p1 > 0,05 p2 > 0,05	2,60±0,40 p < 0,001 p1 > 0,05 p2 < 0,001
IgG, г/л	10,00±0,27	12,90±0,50 p < 0,001	13,90±0,60 p < 0,001 p1 > 0,05	14,40±0,90 p < 0,001 p1 > 0,05	12,60±0,30 p < 0,001	12,80±0,80 p < 0,001 p1 > 0,05 p2 > 0,05	9,80±0,60 p < 0,001 p1 < 0,001 p2 < 0,001
ЦИК, у.е.оп.	61,0±2,6	106,1±5,9 p < 0,05	104,5±6,3 p < 0,05 p1 > 0,05	105,6±8,6 p < 0,05 p1 > 0,05	105,7±6,1 p < 0,05	138,7±8,8 p < 0,001 p1 < 0,001 p2 < 0,001	250,3±9,1 p < 0,001 p1 < 0,001 p2 < 0,001

Примечание: p – различия с контролем; p1 – различия до и на фоне ПВТ; p2 – различия на фоне ПВТ между группами.

торое снижение уровня ЦИК, однако гораздо менее выраженное, чем в основной группе. Поэтому, в целом, уровень ЦИК в группе сравнения оставался в 1,4 раза выше нормы ($p < 0,01$), а содержание наиболее патогенных среднемoleкулярных комплексов – в 1,5 раза. Таким образом, использование ронколейкина в составе ПВТ ХВГС способствует нормализации общего количества ЦИК и их молекулярного состава, в то время как в группе пациентов, получавших только стандартное лечение, сохранялись существенные сдвиги данных показателей, а именно, повышенный уровень

ЦИК преимущественно за счет наиболее патогенной среднемoleкулярной фракции.

В сыворотке крови обследованных пациентов в обеих группах до лечения достоверно увеличивалось содержание всех трех классов иммуноглобулинов (табл. 2). Установлено достоверное повышение уровня IgG. Более чем в 2 раза при оценке «средних» значений уровень иммуноглобулина класса М превышал показатели «средней» контрольной группы ($p < 0,001$). Наибольшей выраженности у наблюдаемых пациентов достигала продукция IgA ($p < 0,001$). Полученные результаты согла-

ТАБЛИЦА 3. СОСТОЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ХВГС С УЧЕТОМ СХЕМ ЛЕЧЕНИЯ (M±m)

Показатель	Сроки обследования	Основная группа (n = 19)	Группа сравнения (n = 22)	p*
Фагоцитарная активность нейтрофилов, %	I	48,01±3,00	50,70±3,52	> 0,1
	II	51,01±2,82	52,40±3,14	> 0,1
Фагоцитарный резерв, у.е.	I	0,98±0,12	0,97±0,18	> 0,1
	II	1,53±0,09	0,99±0,19	< 0,05
НСТ-тест, %	I	7,30±0,09	7,50±0,18	> 0,1
	II	10,00±0,50	6,50±0,89	< 0,01
Резерв НСТ-теста, у.е.	I	1,90±0,05	1,79±0,11	> 0,1
	II	2,60±0,02	1,60±0,33	< 0,01
Индекс активации нейтрофилов, у.е.	I	2,11±0,04	2,06±0,09	> 0,1
	II	3,10±0,02	2,10±0,06	< 0,05

Примечание: I – до начала лечения, II – на 10 неделе ПВТ; * – «p» вычислен между аналогичными показателями основной группы и группы сравнения.

суются с литературными данными отечественных и зарубежных авторов и свидетельствуют об активации гуморального звена иммунитета в исследуемой группе пациентов [6, 7, 14]. При проведении корреляционного анализа была установлена обратная взаимосвязь между уровнем крупномолекулярной фракции ЦИК и концентрацией IgA ($-0,65$, $p < 0,001$) при меньшей зависимости образования указанной фракции ЦИК от содержания IgM ($-0,26$) и IgG ($-0,32$). Выявленная активация гуморального иммунитета при хронической инфекции, по-видимому, отражает особенности взаимодействия макроорганизма с антигеном, характеризующимся слабовыраженной иммуногенностью. Данное положение легло в основу для проведения иммунореабилитации ХВГС на фоне этиотропной терапии интерферонами. Изменений концентрации IgG на фоне лечения в обеих группах выявлено не было. Так, уровень IgG в сыворотке крови пациентов основной группы до начала лечения составил $12,90 \pm 0,50$ г/л, что превышало уровень средне-нормальных показателей ($10,00 \pm 0,27$ г/л, $p < 0,001$). После применения ронколейкина с противовирусным лечением исследуемый показатель значимо не менялся и составил $13,90 \pm 0,60$ г/л ($p > 0,05$). Однако наблюдалась обратная взаимосвязь уровня IgG в сыворотке крови от содержания ЦИК патогенной среднемолекулярной фракции ($-0,45$, $p < 0,001$). У пациентов основной группы выявлена тенденция к снижению концентрации IgM в сыворотке крови, не достигая нормальных значений, и нормализация концентрации IgA с $2,60 \pm 0,30$ г/л до $1,08 \pm 0,09$ г/л ($p < 0,001$).

При изучении фагоцитарной активности нейтрофилов достоверных различий до и после лечения ронколейкином выявлено не было (табл. 3). По современным данным сведения о характеристиках фагоцитарного резерва, а также спонтанном и стимулированном НСТ-тесте, являются одними из наиболее важных показателей состояния врожденного иммунитета, в частности, функциональной активности и резервного потенциала фагоцитов. Наши исследования показали, что отмечено иммуномодулирующее влияние ронколейкина на фагоцитарное звено у пациентов с ХВГС (достоверно увеличился резерв нейтрофилов). Наблюдалось увеличение резерва НСТ ($p < 0,01$) и индекса активации нейтрофилов ($p < 0,05$) у пациентов на фоне ПВТ с ронколейкином, что указывает на повышение резервных метаболических возможностей нейтрофильных гранулоцитов и усиление микробоцидной активности внутриклеточных процессов.

Выводы

Таким образом, проведение иммунокоррекции с применением ронколейкина в комбинации со стандартной ПВТ ХВГС патогенетически обосновано и должно способствовать в дальнейшем повышению эффективности этиологического лечения, что является целью нашего исследования в перспективе. Применение ронколейкина в комбинации ПВТ ХВГС определяет возможность оптимизации существующих протоколов лечения.

Список литературы

1. Агапитова С.В., Старостина Н.М., Пронкина Н.В., Кожевников В.С., Черных Е.Р., Козлов В.А. Характеристика иммунных дисфункций у пациентов с хроническими вирусными гепатитами и циррозом печени // Сибирский мед. журн. — 2008. — Т. 2, № 3: Дни иммунологии в Сибири-2008: материалы науч. конф. с междунар. участием. — С. 79.
2. Арямкина О.Л. Хроническая HBV- и HCV-инфекция и рак печени: клинко-эпидемиологические и дифференциально-диагностические параллели // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2006. — № 2 — С. 36–39.
3. Ивашкин В.Т. Механизмы иммунной толерантности и патологии печени // Росс. журн. гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии. — 2009. — № 2. — С. 8–13.
4. Каминский Ю.В., Скляр Л.Ф., Маркелова Е.В. Клинико-морфологические и иммунологические параллели при хронических вирусных гепатитах // Тихоокеанский мед. журн. — 2005. — № 1. — С. 17–20.
5. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. — СПб.: ООО «Издательство Фолиант», 2008. — С. 375.
6. Малый В.П., Гололобова О.В. Особенности функционирования иммунной системы при хроническом гепатите С // Междунар. мед. журн. — 2007. — № 2. — С. 58–62.
7. Нагоев Б.С., Понежева Ж.Б. Некоторые аспекты иммунопатологии при хронических гепатитах // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2009. — С. 45–49.
8. Плехова Н.Г., Сомова Л.М. Роль моноцитов/макрофагов в патогенезе вирусных инфекций // Тихоокеанский мед. журн. — 2010. — № 3. — С. 5–9.
9. Скляр Л.Ф., Маркелова Е.В., Полушин О.Г., Токмалаев А.К., Попов А.Ф. Хроническая HCV-инфекция: современные иммуноморфологические аспекты: монография / под ред. Ю.В. Каминского. — М.: Изд-во РУДН, 2006. — 216 с.
10. Соболевская О.Л., Корочкина О.В. Клиническое значение Т-клеточной реакции лимфоцитов

- на антигены вирусов гепатита В и С и уровня цитокинов при противовирусной терапии больных гепатитом С и микст-инфекцией (В+С) // Клиническая медицина. — 2007. — № 7. — С. 63–66.
11. Собчак Д.М., Корочкина О.В. Оценка показателей Т-клеточного иммунитета и медиаторов иммунного ответа у больных хроническим гепатитом С // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2007. — № 2. — С. 37–42.
 12. Ghany M.G., Strader D.B., Thomas D.L., Seeff L.B. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update // J. Hepatol. — 2009. — Vol. 49, N 4. — P. 1335–1374.
 13. Lee S.S., Bain V.G., Peltekian K., Krajden M., Yoshida E.M., Deschenes M., Heathcote J., Bailey R.J., Simonyi S., Sherman M; Canadian pegasys study group. Treating chronic hepatitis C with pegylated interferon alfa-2a (40 KD) and ribavirin in clinical practice // J. Aliment Pharmacol. Ther. — 2006. — Vol. 23. — P. 397–408.
 14. Rehermann B., Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B and hepatitis C virus infection // J. Nat. Rev. Immunol. — 2005. — Vol. 5. — P. 215–229.