

Инфекционные болезни, иммунология, иммунотерапия



УДК 616.36-002.2-085.37

Л.Ф. Скляр, Е.В. Маркелова, Ю.А. Ли, И.С. Горелова

ИММУНОТРОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ РОНКОЛЕЙКИНА НА ФОНЕ ПРОТИВОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКОГО ГЕПАТИТА С

*Владивостокский государственный медицинский университет,
690002, пр. Острякова, д.2, тел.: 8-(423)-242-97-78, e-mail: mail@vgmu.ru, г. Владивосток*

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, содержания иммуноглобулинов и оценка показателей фагоцитоза на фоне комплексного лечения хронического вирусного гепатита С, включающего в себя традиционную противовирусную терапию в составе пролонгированных интерферонов в сочетании с рибавирином и иммунокорректирующую терапию ронколейкином. Использование ронколейкина в составе комплексного лечения ХВГС определяет возможность создания новых оригинальных протоколов лечения.

Ключевые слова: гепатит С, ронколейкин, иммунореабилитация.

L.F. Sklyar, E.V. Markelova, Y.A. Lie, I.S. Gorelova

IMMUNOTROPIC EFFECT OF RONKOLEUKIN AT THE BACKGROUND OF CHRONIC HEPATITIS C THERAPY

Vladivostok State Medical university, Vladivostok

Summary

Hepatitis C antiviral therapy should be followed by immune rehabilitation measures, first of all, aimed at T-cell immunity stimulation and elimination of circulating immune complexes. We studied concentration dynamics of molecular fractions of circulating immune complex, immunoglobulins and phagocytosis indices during combined hepatitis C antiviral therapy, including traditional antiviral therapy (PEG-interferon+ribavirin) and immunotropic component (Ronkoleukin). Ronkoleukin in combined hepatitis C antiviral therapy makes possible to work out a new original treatment protocols.

Key words: hepatitis C, ronkoleukin, immune rehabilitation.

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 фагоцитирующих 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 с двойны-

ми негативными лимфоцитами), что малоэффективно для элиминации антигенов, и, с другой стороны, является основой формирования аутоиммунных реакций и лимфопролиферативных заболеваний [1, 2]. У пациентов с хроническим вирусным гепатитом (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 циркулирующих иммунных комплексов, что подтверждает важную роль ЦИК в иммунопатологических процессах при ХВГ независимо от этиологического фактора [4, 10]. При выборе лечеб-

ной 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 (ИЛ-2) [5]. Дефицит эндогенного ИЛ-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 ИЛ-2. Включение рекомбинантного ИЛ-2 (ронколейкина) в комплексное лечение ХВГ 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 [9, 10]. Следовательно, противовирусная терапия (ПВТ) при ХВГ должна осуществляться с проведением иммунореабилитационных мероприятий, направленных, в первую очередь, на стимуляцию клеточного звена иммунной системы и процессы элиминации ЦИК. Все вышесказанное является патогенетическим обоснованием для включения в программу комплексной терапии ХВГ ронколейкина. Препарат ронколейкин – рекомбинантный интерлейкин-2 человека – является одним из лекарственных средств, используемых при проведении цитокинотерапии. Ронколейкин для инъекций (Roncoleukin, регистрационное удостоверение № 000122/01 – 2000) – лекарственная форма рекомбинантного интерлейкина-2 человека (rIL-2), выделенного и очищенного из клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, в генетический аппарат которых встроен ген человеческого ИЛ-2. Ронколейкин выпускают в ампулах в дозах по 1 мг (1 000 000 МЕ), 0,5 мг (500 000 МЕ), 0,25 мг (250 000 МЕ) действующего начала rIL-2. Рекомбинантный интерлейкин-2 человека (rIL-2) – белок с молекулярной массой 15300 ± 200 Да. rIL-2 человека – структурный и функциональный аналог эндогенного ИЛ-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, содержания иммуноглобулинов и оценка показателей фагоцитоза на фоне комплексного лечения хронического вирусного гепатита С (ХВГС), включающего в себя традиционную противовирусную терапию (ПВТ) в составе пролонгированных интерферонов в сочетании с рибавирином и иммунокорректирующую терапию ронколейкином.

Материалы и методы

Проведено комплексное клинико-лабораторное 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 чел.) только с ПВТ без включения ронколейкина. Группы были сопоставимы по возрасту, полу, длительности хронического заболевания и компонентам ПВТ (пегинтерферон- $\alpha 2$ и рибавирин). Ронколейкин в основной группе вводили по 500 000 ЕД подкожно в плечо два раза в неделю одновременно с ПВТ курсом 8 нед. (2 мес.). Курсовая доза составила 16 инъекций. Все пациенты находились в периоде репликативной вирусной активности, установленной методом ПЦР (АмплиСенс монитор FRT, аналитическая чувствительность 300 МЕ/мл), и обследованы в соответствии с общепринятым клинико-лабораторным стандартом, включая биохимические тесты, инструментальное обследование в виде УЗИ гепатобилиарного тракта и биопсии и/или фибросканирования печени. В качестве контроля обследовали 14 практически здоровых добровольцев. Содержание иммуноглобулинов классов А, М, G в сыворотке крови измеряли методом турбидиметрии на автоматическом анализаторе белков «Turbox» (Финляндия). 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 больного, 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 $K > 1,5$. Для оценки состояния фагоцитарной защиты использовали определение в крови фагоцитарной активности нейтрофилов с помощью фагоцитарного индекса (ФИ) и фагоцитарного числа (ФЧ), бактерицидной активности лейкоцитов методом базального и стимулированного НСТ-теста по индексу активности нейтрофилов (ИАН). 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 больных 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 больных еще не означает их участие 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, количество которых возрастало в абсолютном исчислении в 2,2 раза по

отношению к соответствующему показателю нормы ($p < 0,01$). Количество мелкомолекулярных иммунных комплексов в абсолютном исчислении возрастало в 2,2 раза, в то время как абсолютное содержание крупномолекулярных комплексов практически не менялось. Суммарно содержание средне- и мелкомолекулярной 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. ($p < 0,01$). После завершения лечения в основной группе больных, получавших на фоне ПВТ иммуотропную терапию ронколейкином, определено снижение уровня ЦИК до верхней границы нормы, уменьшение содержания в их составе наиболее патогенной среднемалекулярной фракции (11S – 19S). При этом содержание среднемалекулярных ЦИК в основной группе снизилось с $112,7 \pm 11,3$ до $83,1 \pm 8,4$ у.е. ($p < 0,01$). В группе сравнения также имело место некоторое снижение уровня ЦИК, однако гораздо менее выраженное, чем в основной группе. Поэтому, в целом, уровень ЦИК в группе сравнения оставался после лечения в 1,4 раза выше нормы ($p < 0,01$), а содержание наиболее патогенных среднемалекулярных 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 больных, получавших только общепринятое лечение, сохранялись существенные сдвиги данных показателей, а именно повышенный уровень ЦИК, преимущественно за счет наиболее патогенной среднемалекулярной фракции.

Таблица 1

Концентрация молекулярных фракций ЦИК при ХВГС с учетом лечения ($M \pm m$)

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

Примечание. В числителе – показатели до начала лечения, в знаменателе – после его завершения; «р» вычислен между аналогичными показателями основной группы и группы сравнения.

В сыворотке крови обследованных больных в обеих группах до лечения достоверно увеличивалось содержание всех трех классов иммуноглобулинов (табл. 2). Более чем в 2 раза при оценке «средних» значений уровень иммуноглобулина класса М превышал показатели «средней» контрольной группы ($p < 0,001$). Установлено достоверное повышение уровня IgG. Наибольшей выраженности у наблюдаемых больных достигала продукция IgA ($p < 0,001$). Полученные результаты согласуются с литературными данными отечественных и зарубежных авторов и свидетельствуют об активации гуморального звена иммунитета у исследуемой группы пациентов [6, 7]. 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 на фоне этиотропной терапии интерферонами ХВГС. Изменений концентрации IgG после 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 средненормальных 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 среднемалекулярной фракции ($-0,45$; $p < 0,001$). У пациентов основной группы выявлена нормализация концентрации IgA с $2,60 \pm 0,30$ до $1,08 \pm 0,09$ г/л ($p < 0,001$) и тенденция к снижению концентрации IgM в сыворотке крови, при этом нормальные значения достигнуты не были.

Таблица 2

Содержание иммуноглобулинов и концентрация ЦИК при ХВГС в зависимости от лечения ($M \pm m$)

Показатель	Контроль (n=14)	Основная группа (n=19)			Группа сравнения (n=22)		
		До лечения	После лечения		До лечения	После лечения	
			ч/з 2 нед.	ч/з 3 мес.		ч/з 2 нед.	ч/з 3 мес.
Ig M, г/л	$1,04 \pm 0,02$	$1,78 \pm 0,09$ $p < 0,001$	$2,09 \pm 0,11$ $p < 0,001$ $p_1 > 0,05$	$1,3 \pm 0,14$ $p < 0,05$ $p_1 < 0,001$	$1,80 \pm 0,08$ $p < 0,001$	$2,01 \pm 0,11$ $p < 0,001$ $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	$2,01 \pm 0,24$ $p < 0,001$ $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,001$
Ig A, г/л	$1,08 \pm 0,02$	$2,60 \pm 0,20$ $p < 0,001$	$2,60 \pm 0,30$ $p < 0,001$ $p_1 > 0,05$	$1,08 \pm 0,09$ $p > 0,05$ $p_1 < 0,001$	$2,90 \pm 0,20$ $p < 0,001$	$3,10 \pm 0,31$ $p < 0,001$ $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	$2,60 \pm 0,40$ $p < 0,001$ $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,001$
Ig G, г/л	$10,00 \pm 0,27$	$12,90 \pm 0,50$ $p < 0,001$	$13,90 \pm 0,60$ $p < 0,001$ $p_1 > 0,05$	$14,40 \pm 0,90$ $p < 0,001$ $p_1 > 0,05$	$12,60 \pm 0,30$ $p < 0,001$	$12,80 \pm 0,80$ $p < 0,001$ $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	$9,80 \pm 0,60$ $p < 0,001$ $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$
ЦИК (у.е.оп.)	$61,0 \pm 2,6$	$106,1 \pm 5,9$ $p < 0,05$	$104,5 \pm 6,3$ $p < 0,05$ $p_1 > 0,05$	$105,6 \pm 8,6$ $p < 0,05$ $p_1 > 0,05$	$105,7 \pm 6,1$ $p < 0,05$	$138,7 \pm 8,8$ $p < 0,001$ $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$	$250,3 \pm 9,1$ $p < 0,001$ $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$

Примечания. p – различия с контролем; p_1 – различия до и после лечения; p_2 – различия после лечения между группами.

Таблица 3

Состояние некоторых показателей врожденного иммунитета при ХВГС на фоне лечения (M±m)

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

Примечание. В числителе – показатели до начала лечения, в знаменателе – после его завершения; «р» вычислен между аналогичными показателями основной группы и группы сравнения.

При изучении фагоцитарной активности нейтрофилов достоверных различий до и после лечения ронколейкином выявлено не было (табл. 3). По современным данным, сведения о спонтанном и стимулированном НСТ-тесте, а также характеристиках

фагоцитарного резерва 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 лечения ронколейкином, что указывает на повышение резервных метаболических возможностей нейтрофильных гранулоцитов и усиление микробицидной активности внутриклеточных процессов.

Выводы

Таким образом, применение иммунокоррекции с использованием ронколейкина в сочетании с противовирусным лечением ХВГС патогенетически обосновано и должно способствовать в дальнейшем повышению эффективности противовирусной терапии, что является целью нашего исследования в перспективе. Использование ронколейкина в составе комплексного лечения ХВГС определяет возможность создания новых оригинальных протоколов лечения.

Литература

- Агапитова С.В., Черных Е.Р., Леплина О.Ю. и др. Характеристика иммунных дисфункций у пациентов с хроническими вирусными гепатитами и циррозом печени // Сибирский мед. журнал. – 2008. – Т. 2, № 3. – С. 79.
- 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.
- Ивашкин В.Т. Механизмы иммунной толерантности и патологии печени // Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопрокт. – 2009. – № 2. – С. 8 – 13.
- Каминский Ю.В., Скляр Л.Ф., Маркелова Е.В. Клинико-морфологические и иммунологические параллели при хронических вирусных гепатитах // Тихоокеанский мед. журнал. – 2005. – № 1. – С. 17–20.
- Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. – СПб.: Фолиант, 2008. – С. 375
- Малый В.П., Гололобова О.В. Особенности функционирования иммунной системы при хроническом гепатите С // Международный мед. журнал. – 2007. – № 2. – С. 58–62.
- Нагоев Б.С., Понежева Ж.Б. Некоторые аспекты иммунопатологии при хронических гепатитах // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2009. – С. 45–49.
- Плехова Н.Г., Сомова Л.М. Роль моноцитов/макрофагов в патогенезе вирусных инфекций // Тихоокеанский мед. журнал. – 2010. – № 3. – С. 5–9.
- Скляр Л.Ф., Маркелова Е.В., Полушин О.Г. и др. Хроническая HCV-инфекция: современные иммуноморфологические аспекты: монография [под ред. Ю.В. Каминского] – М.: РУДН, 2006. – С. 213.
- 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) // Клин. медицина. – 2007. – № 7. – С. 63–66.
- 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.

Координаты для связи с авторами: Скляр Лидия Федоровна – доктор мед. наук, доцент кафедры инфекционных болезней ВГМУ, тел.: +7-914-791-65-76, e-mail: lidiya.sklyar@hotmail.com; Маркелова Елена Владимировна – доктор мед. наук, профессор, зав. кафедрой патологической физиологии ВГМУ, тел.: +7-914-707-85-59, e-mail: ratphis-vl@mail.ru; Ли Юлия Александровна – ассистент кафедры инфекционных болезней ВГМУ, тел.: +7-914-976-59-36, e-mail: julianochka-li@rambler.ru; Горелова Ирина Сергеевна – ассистент кафедры инфекционных болезней ВГМУ, тел.: +7-908-446-04-53, e-mail: gorelova_ira@mail.ru.

