

© Коллектив авторов, 2009
УДК 616.36–002.2:616.98:616–08

НЕКОТОРЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕГО ВЛИЯНИЯ ПРОТИВОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ВИРУСНОМ ГЕПАТИТЕ С

В.Х. Фазылов, Я.Р. Мангушева, Э.Г. Гайфуллина
Казанский государственный медицинский университет

Вирус гепатита С (HCV) в настоящее время является одним из ведущих этиологических факторов патологии печени у человека. Частота выявляемости HCV-инфекции достигает 3% в популяции [10]. В мире число инфицированных HCV составляет около 10 млн. человек [2]. В Российской Федерации насчитывается более 2 млн. больных хроническим вирусным гепатитом С (ХВГС) [6].

Отличительной особенностью хронического гепатита С (ХГС) является латентное или малосимптомное течение на протяжении длительного времени – от нескольких лет до десятилетий. Однако, несмотря на кажущееся благополучие, почти у трети больных ХГС ожидается развитие таких серьезных осложнений, как цирроз печени и гепатоцеллюлярная карцинома.

В ближайшие несколько десятилетий предполагается увеличение смертности и расходов, связанных с лечением терминальных форм поражения печени HCV, что обосновывает необходимость лечения HCV-ассоциированных заболеваний на максимально ранних сроках [7, 11]. В настоящее время широко определены показания к лечению HCV-инфекции – все больные с различными её формами являются потенциальными кандидатами для противовирусной терапии (ПВТ) за исключением пациентов с декомпенсированным циррозом печени [9].

Препараты интерферона (α -ИФН), обладая выраженным иммуномодулирующим эффектом, являются потенциальным индуктором аутоиммунных процессов [5].

Начало 21 века ознаменовалось созданием пегилированного интерферона α (Пег-ИФН α), использование которого в комбинации с рибавирином позволяет достигать элиминации вируса

более, чем у половины больных ХВГС [8]. Стойкий вирусологический ответ (СВО) на комбинированную терапию Пег-ИФН α с рибавирином у первичных больных ХГС наблюдается в 85% случаев, в том числе в 76% у больных с 1 генотипом HCV и в 98% – с не-1 генотипом HCV [4].

Известно, что α -ИФН проявляет широкий спектр иммунологической активности: стимулирует фагоцитоз, усиливает активность NK-клеток и других эффекторных клеток иммунной системы, индуцирует выработку цитокинов, усиливает экспрессию продуктов главного комплекса гистосовместимости 1 класса на поверхности инфицированных клеток [1,3].

Исходя из вышеперечисленного, ПВТ ХГС должна быть индивидуализирована и проводиться с тщательным мониторингом активности инфекционного процесса.

Целью нашего исследования явилось изучение эффективности противовирусной терапии ХГС и определение взаимосвязи аутоиммунных реакций с фагоцитарной активностью лейкоцитов на её фоне.

Материал и методы. Под наблюдением находилось 88 пациентов с ХГС, 43 (48,8%) мужчин и 45 (51,2%) женщин в возрасте от 18 до 49 лет (средний возраст $28,90 \pm 0,65$ лет) с предположительным сроком инфицирования от 1 до 32 лет. Стаж болезни до 5 лет наблюдался у 55 (62,5%), более 5 лет – у 12 (37,5%) больных. Контрольную группу составили 32 здоровых добровольца.

Вероятные пути инфицирования удалось установить у 69 (78,4%) больных ХГС. Наиболее часто инфицирование происходило при внутривенном употреблении наркотиков – 22 (25%) и гемотрансфузиях – 17 (19,3%), при операциях – у 12 (13,6%), посещении стоматолога – у 7 (8%), семейно-бытовых контактах – у 7 (8%) пациентов; профессиональное заражение (медицинские работники) отмечено у 4 (4,5%) больных ХГС.

Диагноз ХВГС устанавливали на основании клинико-эпидемиологических данных и специ-

Фазылов Вильдан Хайрулаевич, д. м. н., профессор,
зав. кафедрой инфекционных болезней.
Тел.: (843) 267-80-72.
E-mail: nulik@mi.ru

фической лабораторной диагностики. Серологические маркеры HCV (анти-HCVcore, NS3,4,5, IgM, IgG) в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом, а вирусную нагрузку (РНК-HCV) с генотипированием – методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Из 88 пациентов низкая вирусемия обнаружена у 16 (18,2%), умеренная у 35 (39,8%), высокая у 37 (42%). У всех больных проводилось генотипирование, при этом у 48 (54,5%) пациентов определялся 1 (1а, 1в), у остальных 40 (45,5%) – не-1 (2а, 3а) генотип.

Морфологическое исследование биоптатов печени с вычислением индекса гистологической активности по бальной системе Knodell и степени фиброза проводилось у 15 больных ХГС. По результатам биопсии печени признаки умеренного и тяжелого хронического гепатита выявлялись у 66,6% больных и у 53,3% – признаки фиброза.

У большинства больных клинические проявления заболевания ограничивались астеническим синдромом. Наиболее частыми были жалобы на повышенную утомляемость, немотивированную слабость, снижение трудоспособности. Диспепсические жалобы чаще встречались у больных с сопутствующими заболеваниями желудочно-кишечного тракта (хроническим холециститом, панкреатитом, гастродуоденитом и др.).

При первичном биохимическом исследовании крови больных ХГС активность сывороточных трансаминаз была низкой (N-1,5N) у 28 (31,8%), незначительно повышенной (1,5-3N) у 30 (34,1%), умеренно повышенной (3,5-5N) у 24 (27,3%) и высокой (>5N) – у 6 (6,8%) больных.

До начала лечения всем больным проводилось исследование показателей периферической крови, иммунного статуса, исследование уровня аутоантител (ANA, AMA, ASMA, LKM, anti-GPA), криоглобулинов, гормонов щитовидной железы, УЗ-исследование гепатобилиарной зоны и щитовидной железы.

После установления клинического диагноза с оценкой активности инфекционного и воспалительного процесса всем больным ХВГС была назначена индукционная ПВТ с введением высоких доз ИФН- α 2 (3-5 млн. ЕД) в ежедневном режиме («Реаферон», «Инtron А», «Роферон») в комбинации с рибавирином («Ребетол», «Веро-рибавирин») 13 мг/кг/сут. Длительность курса лечения составила 48 недель. В исследовании участвовали пациенты, ранее не получавшие противовирусную терапию.

На фоне лечения всем больным проводилось контрольное обследование в сроки 3, 6, 9, 12 месяцев терапии и через 6 месяцев после ее завершения.

Учет реакции иммунофлюоресценции проводили на проточном цитофлуориметре «FACSscan» (Becton Dickinson, USA).

Криоглобулины определяли спектрофотометрически на SPECTROMOM-204 (или ФЭК) при длине волны 500 нм по разности оптических плотностей $\Delta OD = OD_4 - OD_{37}$, где OD_4 и OD_{37} – оптические плотности растворов при темпера-

туре 4 °C и 37 °C соответственно.

Определение аутоантител – антинуклеарных (ANA), гладкомышечных (ASMA), антимитохондриальных (AMA), печеночно-почечных микросомальных (LKM-1) и антител к париетальным клеткам желудка (anti-GPA) проводили методом иммунофлюоресценции с использованием тест-систем (IMMGO Diagnostics, USA).

Функционально-метаболическую активность нейтрофилов определяли в тесте с нитросиним тетразолием (НСТ-тесте) в спонтанном и индуцированном вариантах по методу Р.Н. Рас и соавт. (1968) в модификации М.Е. Виксмана и А.Н. Маянского (1979). В индуцированном НСТ-тесте в качестве стимулятора применялся пирогенал в конечной концентрации 0,5 мкг/мл.

Фагоцитарная активность лейкоцитов оценивалась по способности клеток захватывать *St. aureus*. Рассчитывали фагоцитарную активность нейтрофилов (ФАН), фагоцитарное число (ФЧ), абсолютный фагоцитарный показатель (АФП).

Общекплементарная активность сыворотки определялась по 50% гемолизу эритроцитов барана по М. Mayer, E. Kabat (1961).

Циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК) исследовали методом преципитации полиэтиленгликолем 6000 по М. Dugeon и соавт. (1977).

Математическую обработку статистических данных проводили общепринятыми методами статистики, достоверность различия полученных данных определяли по t-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Оценку эффективности противовирусной терапии препаратами α -ИФН по критериям Европейской ассоциации по изучению печени проводили через 6 месяцев после завершения схемы лечения. Отсутствие сывороточных маркеров репликации в эти сроки свидетельствовало о СВО. В нашем исследовании из 88 больных ХГС, находившихся на ПВТ, 74 (84,1%) пациента получили полный курс лечения, остальные 14 (15,9%) пациентов самостоятельно прекратили лечение ввиду отсутствия приверженности к терапии. Из 74 пациентов у 62 (83,7%) получен СВО, у 12 (16,2%) пациентов вирусемия сохранилась в течение 3 или 6 мес. лечения или возобновилась на поздних сроках лечения – на 9, 12 месяце, а также через 6 месяцев после годового курса α -ИФТ.

С целью прогнозирования результатов противовирусного лечения всем пациентам ХВГС проводилась ПЦР-детекция на РНК-HCV через 4 недели от начала терапии. На этом сроке у 68 (91,9%) пациентов наблюдалось отсутствие в крови РНК вируса, что расценивалось как быстрый вирусологический ответ (БВО), из них у 61 (89,7%) пациента наблюдалось формирование СВО. У остальных 6 больных с отсутствием БВО в 83,3% случаев наблюдался рецидив вирусемии на сроке СВО.

Результаты исследования эффективности индукционной ПВТ интерфероном и рибавирином показали частоту СВО в 65,8% случаев при 1 генотипе и 97,2% - при не-1 генотипе вируса.

Для более тщательного обследования боль-

ных ХГС была разработана специальная анкета с целью диагностики аутоиммунных реакций, которая охватывала характерные для этого состояния жалобы и данные объективного обследования. Из жалоб «внепеченочного» характера отмечались боли в суставах (19,1%), мышечная слабость (15,5%), сухость во рту (15,4%), ощущение онемения и зябкости рук (9,5%). При осмотре выявлены сухость кожи у 19,1%, сухость губ и заеды у 14,3% пациентов.

Самостоятельные заболевания аутоиммунного характера, ассоциированные с HCV-инфекцией, были диагностированы у 7 (7,9%) пациентов ХГС. У 3 больных (3,4%) диагностирован аутоиммунный тиреоидит, у 2 (2,3%) – псориаз. Красный плоский лишай имел место у 1 (1,1%), синдром Шегрена – также у 1 (1,1%) больного.

Таким образом, клинические симптомы аутоиммунных реакций и самостоятельные аутоиммунные заболевания наблюдались относительно редко. Возможно, сказались небольшие сроки течения ХГС от момента инфицирования и молодой возраст больных.

Более рельефная картина аутоиммунитета наблюдалась при исследовании лабораторных показателей.

Отмечено, что неспецифические аутоантитела у здоровых людей, как правило, не выявляются. По нашим наблюдениям, из обследованных пациентов у 36 (40,9%) были обнаружены аутоантитела. Большая часть определяемых аутоантител не превышала титра 1:80. Таким образом, уже на ранних сроках течения HCV-инфекции отмечалось незначительное повышение в сыворотке крови аутоантител, отражающее наличие неспецифической аутоиммунной реакции.

Из лабораторных параметров выявлено увеличенное содержание криоглобулинов, в 2 раза превышающее их уровень у здоровых ($0,042 \pm 0,0047$ опт. ед.; $p < 0,001$).

Хорошо известно, что тромбоциты в организме человека участвуют в процессах свертывания, являясь маркерами гемостаза, а также отражают состояние иммунной системы, снижаясь при иммунодефицитах. Надо полагать, наблюдаемое нами снижение уровня тромбоцитов на 9,3% ($224,018 \pm 5,93 \times 10^9$ /мкл, $p < 0,05$) связано в том числе с изменением иммунного статуса.

Альфа-интерфероны сами по себе не обладают сильным противовирусным действием, их эффект осуществляется опосредованно – через синтезированные ферменты и ингибирующие пептиды, которые блокируют процессы транскрипции и трансляции вирусного генома и индуцируют каскад реакций, ведущих к элиминации вирусной РНК [3]. Однако, в ответ на модулирующее иммунную систему действие α -ИФН возникают разнообразные побочные эффекты, многие из которых проявляются аутоиммунными феноменами. Так, во время ПВТ происходит нарастание в большей степени симптомов характерных для аутоиммунных реакций – сухости кожи и слизистых, артралгий и миалгий, астеновегетативного синдрома. Наиболее часто из побочных эффек-

тов ПВТ наблюдались гриппоподобный синдром (98,2%), выпадение волос (61,9%), неврологические и психические нарушения (61,9%), снижение массы тела (57,5%), в 11,5% случаев наблюдалось поражение щитовидной железы от гипотиреоза до АИТ. У 11,2% на фоне ПВТ отмечались бактериальные инфекции, что, возможно, свидетельствует о подавлении фагоцитарного звена иммунитета.

В патогенезе аутоиммунных проявлений, нередко имеющих место при ХГС, лежат иммунно-комплексные реакции. Как известно, у здорового человека идет непрерывное образование и удаление ЦИК из крови путем фагоцитоза при активном участии комплемента. Комплемент, встраиваясь в состав ЦИК, способствует разрыву связей между антигеном и антителом, препятствует образованию крупных нерастворимых агрегатов, при этом удерживает их растворимые формы, легко удаляемые из организма. Причиной избыточного содержания ЦИК при HCV-инфекции [5] является избыток вирусного антигена, а образующиеся в недостаточном количестве антитела теряют способность нейтрализовать вирус. ЦИК откладываются в печени и в других органах, провоцируя воспалительные реакции. По мере увеличения ЦИК перестают «справляться» с функциями системы комплемента и фагоцитоза. В этих условиях страдает фагоцитарная активность лейкоцитов.

В нашем исследовании была проведена оценка фагоцитарного звена иммунитета и уровня ЦИК.

Результаты при первичном обследовании больных ХГС показали дефицит ФАН на 13,6% ($1,84 \pm 0,13\%$; $p < 0,05$), общего количества частиц *St.aureus*, фагоцитированных нейтрофилами в виде снижения АФП, на 33,5% ($8117,11 \pm 769,03 \times 10^6$ /л; $p < 0,001$) при компенсаторном повышении функционально-метаболической активности нейтрофильных гранулоцитов в спонтанном НСТ-тесте на 65,8% ($15,09 \pm 1,43\%$; $p < 0,01$), их резервных возможностей в индуцированном варианте НСТ-теста на 34,7% ($54,07 \pm 3,12\%$; $p < 0,01$) и понижении уровня комплементарной активности сыворотки на 28,3% ($43,39 \pm 1,73$ Е/мл; $p < 0,001$) на фоне повышенного на 70% содержания ЦИК ($0,051 \pm 0,005$ опт. ед.; $p < 0,001$).

В динамике альфа-интерферонотерапии выявлено достоверное изменение отдельных фагоцитарных показателей по сравнению с контролем, в виде снижения ФАН через 3 месяца на 53,1% ($1,00 \pm 0,06\%$; $p < 0,001$), 6 месяцев – на 45,1% ($1,17 \pm 0,12\%$; $p < 0,001$), 9 месяцев – на 46% ($1,15 \pm 0,14\%$; $p < 0,001$), 12 месяцев – на 29,6% ($1,50 \pm 0,14\%$; $p < 0,001$), 6 месяцев после отмены терапии на 29,6% ($1,50 \pm 0,19\%$; $p < 0,01$), АФП на тех же сроках лечения соответственно на 62,5% ($4581,44 \pm 379,05 \times 10^6$ /л; $p < 0,001$), 51,3% ($5944,05 \pm 547,80 \times 10^6$ /л; $p < 0,001$), 58,8% ($5030,00 \pm 784,23 \times 10^6$ /л; $p < 0,001$), 36,5% ($7746,93 \pm 1085,36 \times 10^6$ /л; $p < 0,01$), 50,9% ($5989,61 \pm 932,61 \times 10^6$ /л; $p < 0,001$), ФЧ через 3,

9 месяца терапии и 6 месяцев после ее отмены соответственно на 21,1% ($4,52 \pm 0,24 \times 10^6$ /л; $p < 0,01$), 23,2% ($4,40 \pm 0,30 \times 10^6$ /л; $p < 0,01$) и 20,6% ($4,55 \pm 0,33 \times 10^6$ /л; $p < 0,01$). Функционально-метаболическая активность нейтрофилов компенсаторно повышалась в спонтанном НСТ-тесте на сроках 3, 6, 9 месяцев лечения и через 6 месяцев после его отмены соответственно на 70,3% ($15,5 \pm 1,73\%$; $p < 0,01$), 87% ($17,02 \pm 1,47\%$; $p < 0,001$), 68,8% ($15,36 \pm 2,09\%$; $p < 0,01$), 70% ($15,47 \pm 2,50\%$; $p < 0,05$), в меньшей степени в индуцированном НСТ-тесте через 6 месяцев терапии на 35,4% ($54,31 \pm 2,80\%$; $p < 0,01$). На сроке 6 месяцев после завершения курса ПВТ функционально-метаболическая активность нейтрофилов в индуцированном НСТ-тесте оставалась повышенной на 38,4% ($55,53 \pm 4,12\%$; $p < 0,01$).

Уровень компонента снижался на сроках 3, 6, 9 месяцев от начала ПВТ по отношению к уровню у здоровых соответственно на 15,6% ($51,08 \pm 2,53$ Е/мл; $p < 0,01$), 19% ($49,00 \pm 2,47$ Е/мл; $p < 0,001$), 16,1% ($50,77 \pm 3,21$ Е/мл; $p < 0,05$) на фоне повышения ЦИК на всех контрольных сроках ПВТ на 61,6% ($0,048 \pm 0,004$ опт.ед; $p < 0,001$), 58,3% ($0,047 \pm 0,002$ опт.ед; $p < 0,001$), 77,6% ($0,053 \pm 0,003$ опт.ед; $p < 0,001$), 57,6% ($0,047 \pm 0,003$ опт.ед; $p < 0,001$) с их полным восстановлением к 6 месяцам после отмены α -ИФН.

Таким образом, выявленные изменения в вышеперечисленных параметрах в той или иной степени отражают нарушения иммунного состояния у больных ХВГС, усугубляющиеся на фоне альфа-интерферонотерапии.

Выводы

1. Эффективность (СВО) противовирусного лечения ХГС с использованием метода ежедневного введения высоких доз альфа-интерферона в комбинации с рибавирином (достижение стойкого вирусологического ответа) составила 83,7%, наилучшие результаты получены у больных с не-1 генотипом – 97,2%, с 1 генотипом – 65,8%. Отсутствие быстрого вирусологического ответа позволяет прогнозировать неблагоприятный исход лечения.

2. У больных хроническим вирусным гепатитом С наблюдаются аутоиммунные реакции в виде отдельных симптомов и синдромов и в 7,9% случаев аутоиммунные заболевания (тиреоидит, псориаз, красный плоский лишай, синдром Шегрена) на фоне тромбоцитопении, повышенного содержания криоглобулинов, циркулирующих иммунных комплексов и неорганоспецифических аутоантител.

3. Аутоиммунные процессы при хроническом вирусном гепатите С, сопровождающиеся подавлением фагоцитарных механизмов защиты на фоне снижения общей активности компонента, модулируются противовирусными средствами в процессе длительной терапии.

Литература

1. Беляева, Н.М. Вирусные гепатиты. Прошлое и будущее / Н.М. Беляева // Лечебная часть, инфекции. – 2004. – №3. – С. 9.
2. Лопаткина, Т.Н. Современная противовирусная терапия хронического гепатита С / Т.Н. Лопаткина // Клиническая фармакология и терапия. – 2002. – №1. – С. 11-14.
3. Маммаев, С.Н. Продукция цитокинов у больных хроническим вирусным гепатитом С на фоне терапии интерфероном-альфа. / С.Н. Маммаев, Е.А. Лукина, С.А. Луговская, А.А. Левина, Ю.О. Шульпекова, М.Е. Почтарь, В.Т. Ивашкин // Клиническая лабораторная диагностика. – 2001. – №7. – С. 45-48.
4. Никулкина, Е. Эффективность и переносимость комбинированной терапии пегилированным интерфероном α -2b и рибавирином у больных хроническим гепатитом С в России / Е. Никулкина, В. Сюткин, Т. Лопаткина, Т. Игнатова, П. Крель, И. Никитин, О. Корочкина, М. Маевская [и др.] // Сб. статей российских авторов «Хронический гепатит С». – С. 4-7.
5. Рабсон, А. Основы медицинской иммунологии / А. Рабсон, А. Ройт, П. Делвз. – М., 2006. – 920 с.
6. Шахгильдян, И.В. Парентеральные вирусные гепатиты (эпидемиология, диагностика, профилактика) / В.И. Шахгильдян, М.И. Михайлов, Г.Г. Онищенко. – М., 2003. – 165 с.
7. Armstrong, G.L. The past incidence of hepatitis C Virus infection: implications for the future burden of chronic liver disease in the United States / G.L. Armstrong // Hepatology. – 2000. – P. 777-782.
8. Fried, M.W. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection / M.W. Fried // N. Engl. J. Med. – 2002. – Vol. 347. – P. 975-982.
9. National Institute of Health Consensus development conference statement: Management of hepatitis C: 2002 // Hepatology. – 2002. – Vol. 36, № 5, Suppl.1. – P. 3-19.
10. Wasley, A. Epidemiology of hepatitis C virus: geographic, differences and temporal trends / A. Wasley, M. Alter // Semin. Liver Dis. – 2000. – Vol. 20. – P. 1-16.
11. Wong, J.B. Estimating future hepatitis C morbidity, mortality, and costs in the United States / J.B. Wong // Am. J. Publ. Health. – 2000. – Vol. 90. – P. 1562-1569.

**НЕКОТОРЫЕ МЕХАНИЗМЫ
ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕГО ВЛИЯНИЯ
ПРОТИВОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ
ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ВИРУСНОМ
ГЕПАТИТЕ С**

**В.Х. ФАЗЫЛОВ, Я.Р. МАНГУШЕВА,
Э.Г. ГАЙФУЛЛИНА**

Изучены эффективность и взаимосвязи аутоиммунных реакций с фагоцитарными механизмами защиты на фоне индукционной комбинированной противовирусной терапии хронического вирусного гепатита С (ХГС). Обследованы 88 пациентов с ХГС в возрасте от 18 до 49 лет, у 62,5% из них предполагаемые сроки инфицирования составляли до 5 лет.

Установлено, что у больных ХГС в 7,9% случаев встречаются аутоиммунные заболевания на фоне присутствия различных маркеров аутоиммунитета. Аутоиммунные реакции при ХГС сопровождаются подавлением фагоцитарной активности лейкоцитов при снижении активности комплемента, усугубляются под влиянием альфа-интерферонотерапии и отражают нарушения фагоцитарного звена иммунитета.

Наилучшие результаты лечения ХГС получены у больных с не-1 генотипом. Отсутствие быстрого вирусологического ответа позволяет прогнозировать неблагоприятный исход лечения.

Ключевые слова: HCV-инфекция, иммунопатогенез, противовирусная терапия

**SOME MECHANISMS
IMMUNOMODULATING INFLUENCE OF
ANTIVIRUS THERAPY AT CHRONIC VIRUS
HEPATITIS C**

**FAZYLOV V.H., MANGUSHEVA Ya. R.,
GAIFULLINA E.G.**

Efficiency and interrelations of autoimmune reactions with phagocyte mechanisms of protection on a background of induction combined antiviral therapy of chronic viral hepatitis C are investigated. 88 patients with chronic hepatitis C in the age of 18-49 years are surveyed, 62,5 % of them had prospective terms of infection till 5 years.

It is established, that in patients with chronic hepatitis C in 7,9 % of cases there can be autoimmune diseases on a background of presence of various autoimmunity markers. Autoimmune reactions at chronic hepatitis C are accompanied by suppression of phagocytes activity of leukocytes at decrease in activity of complement, are aggravated under influence of alpha-interferon therapy and reflect infringements of phagocyte link of immunity.

The best results of treatment of chronic viral hepatitis C are received from patients with not-1 genotype. Absence of the fast virologic answer allows predicting a failure of treatment.

Key words: the HCV-infection, immunopathogenesis, antiviral therapy