

СПОСОБ ПРОГНОЗА ИНТЕРФЕРОН-РИБАВИРИНДУЦИРОВАННОЙ НЕЙТРОПЕНИИ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ С

*Кафедра инфекционных болезней Ростовского государственного медицинского университета,
Россия, 344022, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29,
тел. (863) 232 92 09. E-mail: d_dontcov@mail.ru*

Применение комбинированной противовирусной терапии позволяет добиться стойкого вирусологического ответа у больных хроническим гепатитом С, однако у некоторых пациентов на фоне лечения развивается выраженная нейтропения. Резкое снижение числа нейтрофилов крови зачастую требует прекращения проводимой терапии. В работе предложен новый способ прогноза нейтропии in vitro у больных хроническим гепатитом С, получающих комбинированную противовирусную терапию.

Ключевые слова: хронический гепатит С, противовирусная терапия, нейтропения, прогноз.

D. V. DONTSOV, Y. M. AMBALOV

METHOD FOR FORECASTING OF INTERFERON WITH RIBAVIRIN INDUCED GRANULOCYTOPENIA IN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C

*Department of infectious diseases of Rostov state medical university,
Russia, 344022, Rostov-on-Don, Nahitchevansky, 29,
tel. (863) 232 92 09. E-mail: d_dontcov@mail.ru*

The patients with chronic hepatitis C, who received combination antiviral therapy, were able to achieve firmness virusological results. Some patients, however, during the treatment developed granulocytopenia. When neutrophils in blood drops sharply, often required to stop the current treatment. In presence, through in-vitro we offer new method for forecasting granulocytopenia in patients with chronic hepatitis C in combination antiviral therapy.

Key words: chronic hepatitis C, antiviral therapy, granulocytopenia, forecast.

Хронический гепатит С (ХГС), являясь одним из наиболее распространенных инфекционных заболеваний печени, характеризуется выраженной склонностью к затяжному течению и развитию в конечном итоге цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы [7]. В настоящее время применение комбинированной противовирусной терапии (КПТ) препаратами интерферона альфа-2b (ИФН α) и рибавирина позволяет добиться стойкого вирусологического ответа и обеспечить предупреждение неблагоприятных исходов у больных ХГС [3, 13, 14]. Однако у некоторых пациентов на фоне комбинированной противовирусной терапии отмечаются снижение количества нейтрофилов и угнетение их фагоцитарной активности, что может приводить к развитию бактериальных осложнений со стороны различных органов и систем [8, 10]. Выраженная интерферон-рибавирининдуцированная нейтропения требует снижения дозы применяемых препаратов или же их полной отмены [1]. Между тем наиболее важным условием достижения стойкого вирусологического ответа является, как известно, сохранение терапевтической дозы КПТ на максимально высоком уровне [6]. Схемы, применяемые для лечения уже развившегося нейтропенического синдрома у больных ХГС, требуют существенных материальных затрат, что в современных условиях нерационально с позиций фармакоэкономики [5], поэтому разработка доступных методов, направленных на как можно раннее выявление и предупреждение развития нейтропии у данной категории лиц, представляется весьма актуальной.

Цель исследования – изучить у больных хроническим гепатитом С, получающих комбинированную проти-

вовирусную терапию, патогенетическую роль апоптоза нейтрофилов в развитии интерферон-рибавирининдуцированной нейтропии и на основании полученных данных разработать способ ее прогноза.

Методы исследования

Для изучения структурных изменений, происходящих в нейтрофильных гранулоцитах у больных ХГС под действием противовирусных препаратов, определялся показатель повреждения нейтрофилов (ППН) по методике, описанной Л. Б. Юшкевичем с соавт. [12]. Тест заключается в оценке амебиодной активности нейтрофилов крови, которую рассматривают как начальную стадию их апоптоза. При постановке теста учитываются нарушение зернистости цитоплазмы, мелкая фрагментация и расплывчатость ядер нейтрофилов, а также образование, повреждение или распад псевдоподий. Расчет индекса повреждения нейтрофилов проводится по формуле: $(H1 - Hk) / 100$, где H1 – количество поврежденных клеток в опыте; Hk – количество поврежденных в контроле; 100 – количество сосчитанных клеток. Как правило, относительное число нейтрофильных лейкоцитов, вступивших в спонтанный апоптоз (Hk), не превышает 10%. При добавлении в порцию крови специфического индуктора апоптоза у сенсibilизированных к нему лиц амебиодная активность нейтрофилов заметно усиливается (H1), что приводит к резкому увеличению ППН, у несенсибилизированных же лиц уровень ППН остается $\leq 0,1$.

Постановка теста ППН у больных ХГС осуществлялась нами следующим образом. В микропипетку емкостью 0,08 мл набиралась кровь, взятая из пальца

больного, которую вносили в пробирку, содержащую 0,02 мл 5%-ного водного раствора цитрата натрия. Затем в эту же пробирку добавляли 0,02 мл водного раствора индуктора апоптоза нейтрофилов (ИАН), специально разработанного сотрудниками кафедры инфекционных болезней и кафедры биохимии № 1 РостГМУ. В качестве ИАН использовали препараты, применяемые у больных ХГС в качестве КПП: 80 мг (1/5 разовой дозы) ребетол и 0,6 млн. МЕ (1/5 суточной дозы) альтевира, разведенные в 1,0 л 0,9%-ного раствора натрия хлорида. Такое соотношение компонентов ИАН подобрано с учетом фармакокинетики (абсолютная биодоступность, максимальная концентрация препарата в плазме, объем распределения) и терапевтических доз рибавирина и ИФН α [11].

Одновременно проводился контрольный тест, заключавшийся в том, что в пробирку с 0,08 мл крови того же испытуемого лица добавлялось 0,04 мл 5%-ного раствора цитрата натрия уже без ИАН. Опытная и контрольная пробирки помещались в термостат на 2 часа при температуре 37° С, затем из каждой порции крови готовились мазки с окраской по Романовскому-Гимза. Под иммерсионным увеличением в каждой мазке считывалось 100 нейтрофилов, учитывался процент поврежденных клеток и рассчитывался ППН.

Стандартность условий данного исследования обеспечивалась использованием точно дозированных порций крови, антикоагулянта, ИАН, постоянством термостатной температуры, неизменностью фактора времени. Объективность учета результатов реакции определялась тем, что в опытной мазке крови оценивалось повреждающее действие ИАН при подсчете 100 однородных форменных элементов – нейтрофилов, а неспецифическая реакция нейтрофилов на условия среды учитывалась путем подсчета 100 элементов в контрольной мазке.

Определение ППН было выполнено у 125 больных ХГС (90 женщин, 35 мужчин), находившихся на лечении в гепатологическом центре МЛПУЗ «Городская больница № 1 им. Н. А. Семашко» г. Ростова-на-Дону в период 2008–2010 гг. Критериями включения пациентов в исследование явились: 1) наличие в крови суммарных antiHCV, выявленных как минимум двукратно в условиях нескольких независимых лабораторий; 2) положительный результат детекции РНК HCV в крови; 3) срок наблюдения не менее 1 года; 4) отсутствие ранее проводимой терапии препаратами рибавирина и ИФН α ; 5) отсутствие тяжелых сопутствующих соматических заболеваний, в том числе и других вариантов гепатитов; 6) отсутствие аутоиммунной патологии; 7) отсутствие декомпенсации заболевания с развитием цирроза печени. Исследуемые лица были равнозначны по своим исходным клинико-лабораторным данным и не имели противопоказаний к проведению антивирусной терапии. Генотипирование HCV осуществляли методом праймерспецифической ПЦР с использованием тест-систем «Амплисенс HCV генотип» фирмы «Интерлабсервис» (Россия). Генотип 1 β HCV регистрировался в 54,4% случаев, 3а – в 25,6%, 2а – в 16,8%. У 4 больных генотип HCV не был идентифицирован. Количество РНК HCV менее 3 $\times 10^5$ МЕ/мл было отмечено у 24,0% наблюдавшихся лиц, от 3 $\times 10^5$ МЕ/мл до 6 $\times 10^5$ МЕ/мл – у 60,8% и более 6 $\times 10^5$ МЕ/мл – у 15,2%. Средний возраст обследованных составил 38,2 $\pm$ 7,4 года, длительность заболевания – 11,7 $\pm$ 5,6 года.

Статистическая обработка данных была проведена пакетом «Microsoft Excel», о достоверности отличий

учитываемых показателей судили по величине t-критерия Стьюдента. Корреляционный анализ проводили по методу квадратов Пирсона.

Результаты исследования

Постановка теста ППН проводилась у больных ХГС перед началом лечебных мероприятий. Среднее значение данного показателя у исследуемых нами пациентов составило 0,11 $\pm$ 0,006. Однако следует отметить, что у 15,2% (n=19) всех испытуемых ППН оказался достоверно выше (p<0,001), чем у оставшихся 84,8% (n=106): 0,28 $\pm$ 0,001 и 0,08 $\pm$ 0,002 соответственно.

После определения ППН всем наблюдаемым лицам проводилась КПП по схеме: альтевир внутримышечно 3 млн. МЕ 3 раза в неделю и ребетол перорально 800–1200 мг в сутки в течение 24–72 недель в зависимости от генотипа HCV, уровня вирусной нагрузки, а также частоты появления быстрого и раннего вирусологического ответа.

В процессе лечения минимум 1 раз в неделю у больных определялся уровень нейтрофилов в крови с помощью гематологического анализатора «МЕК-8222» фирмы «Nihon Kohden» (Япония). Среднее значение абсолютного числа нейтрофилов (АЧН) у больных ХГС перед курсом КПП составило 3,6 $\pm$ 0,09 $\times 10^9$ /L. Динамическое наблюдение за пациентами в течение всего периода КПП показало, что статистически значимое снижение АЧН отмечалось на 8–10-й неделях лечения, достигнув в среднем 1,9 $\pm$ 0,05 $\times 10^9$ /L, p<0,001.

Проведя корреляционный анализ, мы констатировали наличие обратной связи между значением ППН и уровнем АЧН на 8–10 неделях КПП (r=–0,65; p<0,001). Так, у тех пациентов, у которых ППН составил 0,08 $\pm$ 0,002, минимальное количество нейтрофилов оставалось в пределах 2,2 $\pm$ 0,04 $\times 10^9$ /L, что не требовало дополнительной коррекции лечения. Значительно более выраженная нейтропения отмечалась у тех больных ХГС, которые имели в начале исследования среднее значение ППН 0,28 $\pm$ 0,01, минимальный уровень нейтрофилов в этой группе составил в среднем 0,64 $\pm$ 0,04 $\times 10^9$ /L, что оказалось достоверно ниже (p<0,01), чем у остальных, причем у 2 из них АЧН к 8–10-й неделе лечения снизилось до 0,45 $\times 10^9$ /L, что привело к отмене проводимой КПП.

Следует отметить, что у 2 пациентов, несмотря на ППН, равный 0,24, минимальный уровень нейтрофилов в крови, тем не менее, оставался в пределах допустимой нормы, т. е. выше 0,75 $\times 10^9$ /L [1]. Однако данным лицам параллельно с антивирусным лечением каждые 3 дня проводилось внутривенное введение 20 мл гемолизата аутокрови (ГАК) по методике, описанной Ю. М. Амбаловым с соавт. [2]. Отсутствие у этих больных выраженной нейтропии, возможно, свидетельствует о стимулирующем влиянии ГАК на клетки миелоидного ряда. Выявленный факт представляется весьма интересным с клинической точки зрения и требует дальнейшего исследования, выполнение которого планируется на кафедре инфекционных болезней РостГМУ.

Наличие обратной корреляционной связи позволило нам разработать способ ориентировочного прогноза развития интерферон-рибавирииндуцированной нейтропии у больных ХГС, основанного на постановке теста ППН (И. И. Васильева, Д. В. Донцов, Ю. М. Амбалов, М. А. Пройдаков). Способ прогноза развития нейтропии, вызванной комбинированной противовирусной терапией, у больных хроническим гепатитом С. Заявка на изобретение № 2011102090, приоритет от

20.01.2011). Было установлено, что при выявлении у пациентов величины ППН $\geq 0,24$ с вероятностью более 84% можно судить о высоком риске развития нейтропении у данной категории лиц при проведении им в дальнейшем КПТ. Данный способ технически прост и экономичен, обеспечивает быстрое получение результата и не требует для своего проведения специально оборудованной лаборатории.

Исследования иллюстрируются следующими клиническими примерами.

Больной Т., 42 года, наркологический анамнез не отрицается. В сыворотке крови обнаружен 1b-генотип HCV РНК, вирусная нагрузка 6×10^5 МЕ/мл. Ранее КПТ не получал, периодически принимал силимаринсодержащие гепатопротекторы. Уровень ППН перед проведением противовирусной терапии – 0,26. Через 4 недели от начала проведения КПТ у больного стало отмечаться снижение АЧН. Поскольку через 8 недель проведения КПТ нейтропения достигла $0,7 \times 10^9/L$, доза ИФН α была уменьшена на 50%.

Больная N., 36 лет, страдающая ХГС в течение 7 лет, имеющая 3a-генотип HCV, поступила в гепатологический центр г. Ростова-на-Дону для проведения противовирусной терапии. Самостоятельно принимала эссенциальные фосфолипиды. При биохимическом исследовании крови неоднократно регистрировалась гиперферментемия. Противопоказаний к противовирусной терапии не выявлено. ППН перед началом лечения составил 0,09, АЧН – $3,9 \times 10^9/L$. На 9-й неделе проведения КПТ количество нейтрофилов в крови снизилось до $1,9 \times 10^9/L$, к 15-й неделе лечения оно восстановилось до $3,6 \times 10^9/L$. Так как АЧН оставалось в пределах нормы, больная в коррекции проводимой терапии не нуждалась.

Обсуждение

Как известно, успех современного лечения ХГС в значительной степени лимитируется рядом факторов, к которым относятся генотип HCV, уровень вирусной нагрузки, возраст больного в период лечения, различные внепеченочные поражения, темп прогрессирования фиброза печени, наличие вирусного стеатоза и др. [4]. Неблагоприятное фоновое состояние больных ХГС уменьшает результативность лечения, способствуя формированию нежелательных эффектов проводимой терапии, в том числе развитию интерферон-рибавирининдуцированной нейтропении. В настоящее время большое внимание уделяется такому феномену, как апоптоз нейтрофилов, который, являясь физиологически детерминированным процессом, закодирован в геноме клетки и вызывает серию морфологических изменений, приводящих к ее гибели [9]. Некоторые физические и химические факторы, обладая в малых количествах цитотоксическим эффектом, способны инициировать апоптоз, однако роль этого явления в формировании нейтропении у больных ХГС, получающих КПТ, практически не изучена. Результаты, полученные нами при исследовании 125 больных хронической HCV-инфекцией, позволяют сделать следующие выводы.

Индукция апоптоза нейтрофилов препаратами рибавирина и ИФН α имеет важное патогенетическое значение в развитии нейтропении у сенсibilизированных к ним больных ХГС.

Значение ППН $\geq 0,24$ у больных ХГС свидетельствует о высоком риске развития интерферон-

рибавирининдуцированной нейтропении при проведении им в дальнейшем КПТ.

Больным ХГС, имеющим ППН $\geq 0,24$, целесообразно проводить внутривенное введение гемолизата аутокрови на всем протяжении КПТ с целью профилактики интерферон-рибавирининдуцированной нейтропении.

ЛИТЕРАТУРА

1. Авдеева М. Г., Городин В. Н., Редько Е. Н., Стриханов С. Н., Моренец Т. М. Вирусные гепатиты: стратегия и тактика терапии, организация медицинской помощи: Пособие для врачей. – Краснодар, 2009. – С. 112–113.
2. Амбалов Ю. М., Усаткина А. В., Кузнецов В. П., Коваленко А. П. Эффективность гемолизата аутокрови у больных рожей нижних конечностей // Успехи современного естествознания. – М., 2003. – № 11. – С. 39.
3. Баранова И. П., Афтаева Л. Н., Краснова Л. И., Рыбалкин С. Б. Противовирусная эффективность различных форм интерферона в терапии хронического гепатита С // Инфекционные болезни. – 2010. – Т. 8. № 2. – С. 13–16.
4. Блохина Н. П., Никитин И. Г. Особенности фармакологической динамики и кинетики пегилированного альфа-интерферона «Пегасис»: новые возможности терапии хронического гепатита С // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2002. – Т. 12. № 6. – С. 17–24.
5. Воробьев П. А., Авксентьева М. В., Юрьев А. С., Сура М. В. Клинико-экономический анализ. Оценка, выбор медицинских технологий и управления качеством медицинской помощи. – М., 2004. – 404 с.
6. Исаков В. А. Современная терапия хронического вирусного гепатита С: Какая длительность комбинированной терапии оптимальна и почему? // Клиническая гастроэнтерология и гепатология. – 2009. – Т. 2. № 1. – С. 9–12.
7. Мамаев С. Н., Рамазанов Ш. Р., Буевверов А. О., Маевская М. В., Абдуллаева А. М., Арбуханова Р. М., Дибиров Д. А., Амирова Х. М. Динамика уровней цитокинов сыворотки крови при противовирусной терапии // Клинические перспективы гастроэнтерологии, гепатологии. – 2008. – № 2. – С. 28–31.
8. Мангушева Я. Р., Фазылов В. Х. Влияние альфа-интерферонотерапии на фагоцитарные механизмы защиты при хроническом гепатите С // Инфекционные болезни. – 2009. – Т. 7. № 1. – С. 26–32.
9. Маянский Н. А. Внутренний путь апоптоза нейтрофилов и механизмы антиапоптозного эффекта гранулоцитарного колоние-стимулирующего фактора // Иммунология. – 2004. – Т. 25. № 6. – С. 329–335.
10. Мельник Г. В., Плятс В. И., Городин В. Н., Еремина Г. А. Опыт комбинированной интерферонотерапии хронического гепатита С // Инфекционные болезни. – 2007. – Т. 5. № 2. – С. 75–78.
11. Справочник ВИДАЛЬ. Лекарственные препараты в России. – М., 2010. – 1728 с.
12. Юшкевич Л. Б., Шевырева Н. А. Современные методы клинико-лабораторных исследований в диагностике профессиональных заболеваний. – М., 1973. – С. 53–56.
13. Cheong H. R., Woo H. Y., Heo J., Yoon K. T., Kim D. U., Kim G. H., Kang D. H., Song G. A., Cho M. Clinical efficacy and safety of the combination therapy of peginterferon alpha and ribavirin in cirrhotic patients with HCV infection // Korean j. hepatol. – 2010. – Vol. 16. № 1. – P. 38–48.
14. Wong J. B. Estimating the cost-effectiveness of ribavirin and pegylated interferon alpha-2b for chronic hepatitis // Hepatology. – 2000. – Vol. 32. – P. 425A.

Поступила 14.02.2011