

# ВЫСОКИЕ ТЕХНОЛОГИИ В МЕДИЦИНЕ

## HIGH TECHNOLOGIES IN MEDICINE

© А.Н. Наровлянский, М.Ю. Ледванов, Н.В. Кремень, Н.А. Семеняко, М.Г. Романцов, М.В. Мезенцева, И.В. Фолитар, 2008  
© A.N. Narovlyanskiy, N.V. Kremen, N.A. Semenyako, M.G. Romantsov, M.V. Mezentseva, I.V. Folitar, 2008

### ИММУНОПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ НАЗНАЧЕНИЯ ИММУНОТРОПНЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРИ HCV-ИНФЕКЦИИ

А.Н. Наровлянский<sup>2</sup>, М.Ю. Ледванов<sup>1</sup>, Н.В. Кремень<sup>1</sup>, Н.А. Семеняко<sup>1</sup>,  
М.Г. Романцов<sup>1</sup>, М.В. Мезенцева<sup>2</sup>, И.В. Фолитар<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Санкт-Петербургская государственная медицинская академия им. И.И. Мечникова,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи  
Российской академии медицинских наук, Москва, Россия

Наровлянский А.Н., Кремень Н.В., Семеняко Н.А., Романцов М.Г., Мезенцева М.В., Фолитар И.В. Иммунопатогенетические аспекты назначения иммунотропных препаратов при HCV – инфекции // Вестник Санкт-Петербургской государственной медицинской академии им. И.И. Мечникова. – 2008. – № 3 (28). – С.160–164.

Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургская государственная медицинская академия им. И.И. Мечникова Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию Российской Федерации» (ГОУВПО СПб ГМА им. И.И. Мечникова Росздрава), 195067, Санкт-Петербург, К-67, Пискарёвский пр., 47, тел. /факс: 8 (812) 717-27-07, тел. (812) 543-96-09, факс: (812) 140-15-24 Эл. почта: mechanik@westcall.net; www.mechnik.spb.ru

Государственное учреждение «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Российской академии медицинских наук, Россия, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18, телефон: 8-495-193-43-06

Р е з ю м е . Вирусный гепатит С (ВГС) является иммуноопосредованной инфекцией, при которой повреждение гепатоцитов наступает вследствие реализации как прямого цитопатического эффекта вируса, так и вследствие иммунологически опосредованного повреждения, которое реализуется при взаимодействии цитотоксических лимфоцитов с клетками печени содержащими вирус. В защите организма от инфекций участвуют интерфероны (ИФН) 1-го и 2-го типов, которые, как показали многочисленные исследования, обладают противовирусной и иммуномодулирующей активностью. В этой связи, для оценки иммунного статуса и формирования оптимальных схем лечения было обследовано 30 больных хроническим гепатитом С (ХГС), которые обследовались клинически, биохимически, вирусологически и иммунологически. Проведенное исследование позволило установить наличие у больных ХГС разнонаправленных иммунологических процессов, приводящих к отличной от нормы картине цитокинового спектра, свидетельствующей о дисрегуляции цитокиновой и иммунной системы. Наблюдалось снижение синтеза обоих типов ИФН ( $\alpha$  и  $\gamma$ ) с отсутствием синтеза мРНК ИФН- $\alpha$  и ИФН- $\gamma$  у 52,0% и 67,0% больных соответственно. В процессе лечения имело место увеличение числа больных с наличием гена мРНК к ИФН- $\alpha$  и ИЛ-18; увеличение больных, позитивных по мРНК ИФН- $\gamma$ , и сохранение числа больных, позитивных по мРНК ИЛ-1, -8, -10.

Частота быстрого вирусологического ответа через 4 недели терапии у больных чувствительных к Ингарону и Альфароне при Th1-типе иммунного ответа составила 85,3%. При превалировании Th2-типа иммунологических реакций быстрого вирусологического ответа получено не было.

У лиц не чувствительных к используемым препаратам эффективность терапии была ниже. Так, стойкий вирусологический ответ у лиц, имеющих чувствительность к используемым препаратам, при назначении комбинированной терапии составил 73,3%, а у больных не чувствительных к данным препаратам – 50,0%.

К л ю ч е в ы е с л о в а : хронический гепатит С, интерферон-альфа, интерферон-гамма, интерфероновый статус, Ингарон, Альфарона, цитокиновый профиль, эффективность терапии.

Narovlyansky A.N., Kremen N.V., Semenyako N.A., Romantsov M.G., Mezentseva M.V., Folitar I.V. Immunopatogenetic aspects of immunotropic medicine prescription in HCV-infection // Herald Mechnikov Saint-Petersburg State Medical Academy. – 2008. – № 3 (28). – P. 160–164.

State Educational Establishment of Higher Professional Training «Mechnikov Saint-Petersburg State Medical Academy of the Federal Agency for Public Health and Social Development of the Russian Federation», Russia, 195067, St.-Petersburg, K-67, Piskarevsky prospect, 47, phone/fax: 8 (812) 717-27-07, tel. (812) 543-96-09, fax: (812) 140-15-24, e-mail: mechanik@westcall.net; www.mechnik.spb.ru,

State Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamaleya of RAMS, Russia, 123098, Moscow, str. Gamaleya, 18, tel.: 8-495-193-43-06

**S u m m a r y.** Viral hepatitis C is an immune infection with hepatic impairment due to both direct cytopathic viral action and immune reactions realized by interaction between cytotoxic lymphocytes and hepatic cells containing virus. Interferons I and II types appeared in numerous studies to participate in human infectious defense and to possess antiviral and immunomodulatory effects. That is why 30 chronic hepatitis C patients were studied for the assessment of immune status and optimal treatment schemes forming. Examination included clinical, and laboratory, both immunologic and virologic tests. The investigation allowed us to reveal the different immune processes leading to pathologic cytokine pattern showed immune and cytokine system dysregulation. Decrease of IFN alpha and gamma production was observed with mRNA of IFN alpha and IFN gamma synthesis absence in 52,0% and 67,0% respectively. The raised number of patients with mRNA gene of IFN alpha and IL-18, the raised number of mRNA IFN gamma positive patients and the persisted number of patients with mRNA IL-1, IL-8 and IL-10 were observed.

Rapid virologic response in 4 weeks of therapy in the patients susceptible to Ingaron and Alpharona with Th1 type immune response was observed in 85,3%. Th2 type immune reactions of rapid virologic response were absent.

Therapy benefits were lower in patients without susceptibility to prescribed preparations. Thus sustained virologic response was 73,5% in patients susceptible to these drugs in combined therapy and 50,0% in non-susceptible patients.

**K e y w o r d s:** chronic hepatitis C, interferon alpha, interferon gamma, interferon state, Ingaron, Alpharona, cytokine pattern, therapy benefit.

**В**ирусный гепатит С (ВГС) является прогрессирующей хронической инфекцией с постоянным ростом заболеваемости как во всем мире, так и в Российской Федерации. Если показатель так называемого «носительства» вируса гепатита С в 1999 г. составлял 93,5 на 100 тыс. населения, то в 2005 г. он уже составил 104,8 на 100 тыс. населения [4, 8, 10].

Важнейшей особенностью HCV-инфекции является длительное течение, растягивающееся на многие годы, которое впоследствии принимает характер медленной инфекции с высокой частотой развития цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы. Хронический гепатит С (ХГС) является иммуноопосредованной инфекцией, при которой повреждение гепатоцитов наступает вследствие реализации как прямого цитопатического эффекта вируса, так и вследствие иммунологически опосредованного повреждения, которое реализуется при взаимодействии цитотоксических лимфоцитов с клетками печени, содержащими вирус. Кроме того, при ХГС развиваются аутоиммунные реакции, связанные с высоким сходством белковых структур вируса и клеток печени. Основную роль в патогенезе HCV-инфекции играет Т-клеточное звено иммунитета и от его направленности зависит как исход заболевания, так и характер его течения в целом [1, 6, 7]. В защите организма от инфекций участвуют интерфероны ИФН 1 типа (ИФН- $\alpha$ ), которые, как показали многочисленные исследования, обладают противовирусной и иммуномодулирующей активностью. Их противовирусная активность связана с экспрессией генов 2'-5'-олигоаденилатсинтетазы, cAMP-зависимой протеинкиназы, Mx-белка и др. Белковые продукты этих генов определяют клеточную резистентность макроорганизма, ингибируя репликацию вируса, препятствуя его диссеминации. ИФН- $\alpha$  обладают также выраженным иммунорегуляторным действием, модулируя продукцию антител. Кроме того, ИФН- $\alpha$  повышают клеточную цитотоксичность Т-лимфоци-

тов и естественных киллеров, ингибируя пролиферативную их активность. ИФН- $\alpha$  способствуют преимущественной дифференцировке Т-хелперов в Th1-лимфоциты. Дендритные клетки (ДК) при вирусных и бактериальных инфекциях, так же как и плазмоцитидные моноциты, продуцируют ИФН- $\alpha$ . Следовательно, противовирусная и антибактериальная защита зависит не только от активности макрофагального звена иммунитета, но и от активности ДК. Защита макрофагов и дендритных клеток от вирусов предотвращает развитие фатального синдрома системного воспалительного ответа, характеризующегося высвобождением провоспалительных цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-12, ИФН- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$ ). Цитокины регулируют не только продукцию ИФН- $\alpha/\beta$ , но и индуцируют «противовирусное состояние», которое характеризуется как подавлением вирусной репликации, так и усилением способности клеток лизировать инфицированные вирусом клетки [2, 7, 9, 14].

Если ИФН 1-го типа принимают непосредственное участие в защите от вирусов, то ИФН 2-го типа (ИФН- $\gamma$ ) в иммунной системе занимает более высокое иерархическое положение, влияя на процессы специфического и неспецифического клеточного иммунитета. Гамма-интерферон справедливо называют «иммунным интерфероном». Под влиянием ИФН- $\gamma$  Т-лимфоциты с хелперной направленностью приобретают способность синтезировать, кроме ИФН- $\gamma$ , интерлейкин (ИЛ) 2, 12 и ряд других цитокинов, потенцирующих клеточный иммунитет (Th1-иммунный ответ). Активированный receptor ИФН- $\gamma$  взаимодействует с транскрипционным регуляторным фактором STAT-1 и двумя типами протеинкиназ, которые и фосфорилируют STAT-1, приводя его к димеризации, в такой форме он способен транспортироваться в клеточное ядро и связываться с регуляторными последовательностями генов, вовлеченных в клеточный ответ на данный стимул. Результатом активации этих генов

является формирование клеточной защиты от вирусной инфекции, включением синтеза ИЛ-12, важнейшего партнера ИФН- $\gamma$  в противостоянии вирусным инфекциям [3, 5, 10, 11, 14].

Многое в механизмах иммунорегуляции интерферонов остается неизученным, но биологическая роль интерферонов, по мнению ряда авторов, зависит от интенсивности их продукции в организме и клеточной чувствительности к ИФН. Если продукция ИФН- $\alpha$  индуцирована слабыми индукторами ИФН (к которым относится и HCV), то экспрессия ИФН- $\alpha$  ограничивается первично стимулированными лимфоцитами и дендритными клетками. В этом случае обнаруживаются ИФН- $\alpha$  и ИЛ-12, который способствует экспрессии рецептора ИФН- $\alpha$ . Параллельно CD4+ и CD8+-лимфоцитами увеличивается и продукция ИФН- $\gamma$ . При низкой продукции ИФН- $\alpha$  происходит индукция ответа CD4+-лимфоцитов по типу Th1, а если антиген представлен на молекулах МНС 1 класса, то CD8+ Т-лимфоциты продуцируют гамма-интерферон [7, 12, 13]. Выздоровление может наступить лишь в случае активации Th1-лимфоцитов, которые обеспечивают должный уровень ИФН- $\gamma$ , ИЛ-2 и ФНО- $\beta$ . В элиминации возбудителя важнейшую роль играет Т-клеточный ответ с формированием популяции антигенспецифических Th1-хелперов CD4+ и антигенспецифических МНС-рестриктированных цитотоксических Т-лимфоцитов CD8+, именно от баланса цитокинов зависит эффективность противоинфекционной защиты [1, 6, 10, 12].

Клинические наблюдения свидетельствуют о том, что повышенная продукция Th1-цитокинов, в частности, ИФН- $\gamma$  и ФНО- $\beta$ , необходима для активной защиты от инфекции вирусом гепатита С. В то же время активация Th2-цитокинов, подавляет иммунные реакции в организме, что способствует длительной персистенции возбудителя и создает условия для формирования хронического патологического процесса.

**Цель исследования.** Оценить тип иммунного ответа у больных хроническим гепатитом С для прогнозирования исходов заболевания и для формирования оптимальных схем лечения каждого конкретного больного.

**Материалы и методы исследования.** Для изучения механизмов регуляторного цитокинового ответа и направленности иммунологических реакций было обследовано 30 больных ХГС с умеренной активностью патологического про-

цесса и выраженной репликативностью HCV. Все пациенты были лицами мужского пола со средним возрастом  $31,4 \pm 4,7$  лет. Тяжелых сопутствующих заболеваний, а также алкогольной и наркотической зависимости не было ни у одного человека. Все больные обследовались клинически, биохимически и вирусологически с определением уровня вирусной нагрузки методом количественной PCR на старте терапии и в динамике заболевания. Кроме того, проводилось изучение цитокинового профиля на старте терапии и через месяц от начала лечения, когда оценивался быстрый вирусологический ответ (БВО). Длительность заболевания у больных колебалась от 1,5 до 6 лет, в среднем 3,9 года. Уровень вирусной нагрузки на старте терапии колебался от  $1 \cdot 10^3$  до  $1 \cdot 10^6$  МЕ/мл.

В предыдущих исследованиях авторов установлено влияние лекарственных препаратов, в частности ИФН- $\alpha$ , ИФН- $\gamma$ , индукторов интерферонов, на экспрессию генов цитокинов в мононуклеарах периферической крови у больных ХГС, а также на динамику изменения спектра важнейших цитокинов [2, 4]. Большинство цитокинов являются типичными индуцибельными медиаторами и в постнатальном периоде, как правило, вне воспалительной реакции не синтезируются клетками. Вместе с тем, некоторые цитокины в результате конститутивной экспрессии генов частично синтезируются в организме, регулируя пролиферацию и дифференцировку отдельных клеток в течение всей жизни. Цитокины участвуют в регуляции нормальных физиологических реакций организма. Кроме того, они принимают активное участие при развитии воспалительных реакций на местном и системном уровне, обеспечивая общую защиту организма и регуляцию процессов регенерации тканей [7, 12]. Авторами выявлена позитивная экспрессия генов ФНО- $\alpha$  и ИЛ-12 в мононуклеарах периферической крови у 75% и 70% здоровых доноров соответственно, что свидетельствует о важной регуляторной роли этих цитокинов.

**Результаты исследования и их обсуждение.** При обследовании 30 больных ХГС выявлено резкое снижение частоты встречаемости указанных выше цитокинов (ФНО- $\alpha$  и ИЛ-12) (табл. 1). Можно предположить, что отсутствие экспрессии генов цитокинов ФНО- $\alpha$  и ИЛ-12 приводит к дисрегуляции иммунитета и формированию иммунологических реакций по супрессивному типу.

Таблица 1

## Синтез мРНК у больных хроническим гепатитом С и здоровых доноров

мРНК цитокинов	Частота выявляемости мРНК цитокинов у здоровых доноров, % (n = 100)	Частота выявляемости мРНК цитокинов у больных ХГС, % (n = 30)	Кратность изменения показателя у больных ХГС в сравнении со здоровыми донорами
ИФН- $\alpha$	5.0	48.0	+9.6
ИФН- $\gamma$	30.0	33.0	+1.1
ФНО- $\alpha$	75.0	45.0	-0.6
ИЛ-1	35.0	41.0	+1.2

Таблица 1 (продолжение)

## Синтез мРНК у больных хроническим гепатитом С и здоровых доноров

мРНК цитокинов	Частота выявляемости мРНК цитокинов у здоровых доноров, % (n = 100)	Частота выявляемости мРНК цитокинов у больных ХГС, % (n = 30)	Кратность изменения показателя у больных ХГС в сравнении со здоровыми донорами
ИЛ-2	5.0	43.0	+8.6
ИЛ-4	5.0	17.0	+3.4
ИЛ-6	20.0	44.0	+2.2
ИЛ-8	10.0	7.0	-0.7
ИЛ-10	20.0	32.0	+1.6
ИЛ-12	70.0	41.0	-1.7
ИЛ-18	30.0	45.0	+1.5

Как видно из представленной таблицы, повышение экспрессии генов цитокинов ИФН- $\alpha$ , ИЛ-2, -4, -6, -10, -18 встречалось в 1,5–8,6 раз чаще у больных ХГС, чем у здоровых доноров, что свидетельствует о возможной активации лимфоцитов Th1 типа. Снижение синтеза мРНК ИЛ-8 на фоне повышения экспрессии генов ИЛ-10 и -6 может быть результатом угнетения активности макрофагального звена иммунитета и стимуляции лимфоцитов Th2 типа. Активация лимфоцитов Th2 типа является прогностически неблагоприятным признаком, свидетельствующим о наличии длительно текущей персистирующей инфекции. Кроме того, возможно, что тенденция к усилению встречаемости (+1,2) экспрессии генов ИЛ-1 в группе больных ХГС может указывать на антигенную стимуляцию организма, посредством поступления сигнала от макрофагов к Т-лимфоцитам в процессе первичного антигенного распознавания. Снижение частоты определения синтеза мРНК ИЛ-12 (в 1,7 раза) с одновременным падением встречаемости (-0,6) синтеза мРНК ФНО- $\alpha$ , по-видимому, также свидетельствует о выраженной супрессии активности цитолитических Т-лимфоцитов, NK-клеток и макрофагов, индуцирующих продукцию ИФН- $\gamma$ .

Таким образом, проведенное исследование позволило установить, что у больных ХГС происходят разнонаправленные процессы, приводящие к отличной от нормы картине цитокинового спектра, свидетельствующей о дисрегуляции цитокиновой и иммунной систем.

Анализируя данные о продукции ИФН у больных ХГС, установлено снижение синтеза обоих типов ИФН ( $\alpha$  и  $\gamma$ ) с отсутствием синтеза мРНК ИФН- $\alpha$  и - $\gamma$  у 52,0% и 67,0% больных соответственно. Отсутствие синтеза мРНК интерферонов обоих типов может указывать на возможную блокировку их на уровне транскрипции. В этой связи, представляется целесообразным включение в комплексную терапию больных ХГС экзогенных ИФН- $\alpha$  и - $\gamma$ . Для проведения исследования на доказательном уровне проведена оценка чувствительности организма больных ХГС к ИФН- $\alpha$  и - $\gamma$  методом интерферонового прайминга. Как показали исследования, абсолютное большинство больных имели высокую чувствительность к отечественному препарату Альфарона и препарату Ингарон. Вместе с тем, к препарату Ингарон чувствительность проявляли практически все больные (табл. 2).

Таблица 2

## Чувствительность больных к препаратам интерферона на старте терапии

Препараты, число больных n = 30	Число больных/процент выявленных пациентов, чувствительных к препаратам	Число больных/процент выявленных пациентов, нечувствительных к препаратам
ИФН- $\alpha$ (Альфарона)	19/63,3	11/36,7
ИФН- $\gamma$ (Ингарон)	22/73,3	8/26,7

Чувствительность к обоим типам интерферонов, продемонстрировали 68,3% обследованных. Таким образом, назначение Альфарона и Ингарона представлялось целесообразным.

У данной категории больных проведено изучение цитокинового профиля на старте терапии и через 4 недели от начала лечения. Полученные данные соизвестиялись с результатами противовирусного ответа. В процессе лечения наблюдалось увеличение числа

больных с наличием гена мРНК к ИФН- $\alpha$  и ИЛ-18; кроме того, увеличивался процент больных, позитивных по мРНК ИФН- $\gamma$ , и сохранялся процент больных, позитивных по мРНК ИЛ-1, -8, -10 на фоне сохранения чувствительности этих больных к препаратам интерферонового ряда.

Быстрый вирусологический ответ через 4 недели терапии у больных чувствительных к Ингарону и Альфароне при Th1 типе иммунного ответа наблюдался у

85,3%. При превалировании Th-2 типа иммунологических реакций быстрого вирусологического ответа получено не было.

При проведении сравнительного анализа эффективности терапии больных ХГС, у которых предварительно определялась чувствительность к противовирусным препаратам и без определения чувствительности, установлено, что у лиц нечувствительных к используемым препаратам эффективность терапии была ниже. Так, стойкий вирусологический ответ при назначении комбинированной терапии составил 73,3% у лиц, имеющих чувствительность к используемым препаратам и 50,0% – у больных нечувствительных к данным препаратам.

**Заключение.** В результате проведенного исследования установлено, что для достижения максимального эффекта следует менять методический подход к лечению больных ХГС, внедряя в медицинскую практику методику определения иммунологических параметров, позволяющих оценить характер течения заболевания и его исходы. Кроме того, созрела необходимость в персонализации терапии с подбором лекарственных препаратов и оптимальных схем лечения для каждого конкретного пациента.

#### Список литературы

1. Дранник Г.Н. Клиническая иммунология и аллергология. – М. – 2003. – С. 98–109.
2. Ершов Ф.И. Система интерферона в норме и при патологии. – М., Медицина, 1996. – 240 с.
3. Киселев О.И., Ершов Ф.И. Интерферон-гамма: новый цитокин в клинической практике. – М. – 2007. – С. 15–46.
4. Наровлянский А.Н., Амченкова А.М., Мезенцева М.В., Ершов Ф.И. Клеточная чувствительность к действию интерферона при различных формах вирусной патологии // Вопросы вирусологии. – 2000. – № 3. – С. 20–25.
5. Носик Н.Н. Интерфероны и противовирусный иммунитет. // Интерферону – 50 лет. Материалы научной конференции / Под редакцией академика Ф.И. Ершова. – М., 2007. – С. 72–81.
6. Романцов М.Г., Сологуб Т.В., Шульдяков А.Н., Комисаров С.В. «Тройная» терапия хронического вирусного гепатита С у пациентов с генотипом 1b // Врач. – 2006. – № 7. – С. 1–4.
7. Серебряная Н.Б., Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Семейство интерферонов I типа // Цитокины. – СПб., 2008. – С. 23–41.
8. Сологуб Т.В., Баранова И.П., Коваленко С.Н., Шульдяков А.А., Романцов М.Г. Оптимизация «золотого стандарта» в лечении больных хроническим вирусным гепатитом С // Вестник Санкт-Петербургской государственной медицинской академии им. И.И. Мечникова. – 2006. – № 4. – С. 124–130.
9. Фрейдлин И.С., Тотолян А.А. Клетки иммунной системы. – СПб. – 2001. С. 55–72, 81–98.
10. Эпштейн О.И., Штарк М.Б., Дыгай А.М. Биологические эффекты регуляторов физиологических функций. Интерферон-гамма // Фармакология сверхмалых доз антител к эндогенным регуляторам функций. – М., 2005. – С. 56–67.
11. Katayama K., Kasahara A., Sasaki Y., et al. Immunological response to interferon-gamma priming prior to interferon alpha treatment in refractory chronic hepatitis C in relation to viral clearance. // Viral Hepat. – 2001. – Vol. 8. – № 3. – P. 180–185.
12. Samuel C.E. Antiviral actions of interferons. // Clinical Microbiology review. – 2001. – Vol. 123. – № 1. – P. 209–216.
13. Wang T., Seiwert S. Immunomodulatory activities of IFN-gamma1b in the treatment of chronic HCV infections. // Interferon Cytokine Res. – 2006. – Vol. 26. – № 7. – P. 473–483.
14. Zeuzem S. The American association For the Study of Liver Diseases: new perspectives in the treatment of hepatitis C. // Antivir. Ther. – 2006. – Vol. 11. – № 2. – P. 267–271.