

ИММУНОФАРМАКОЛОГИЯ

ВОЗМОЖНОСТИ ИНТЕРФЕРОН-ИНДУЦИРУЮЩЕЙ ТЕРАПИИ ПРИ ЛАТЕНТНОЙ HBV-ИНФЕКЦИИ

В. В. Стельмах¹

Описаны иммунные нарушения, развивающиеся на фоне дисфункции мононуклеарных фагоцитов печени и хронического воспаления в печеночной паренхиме с элементами аутоальтерации иммунными факторами, их роль при латентной HBV-инфекции. Освещены возможности использования лабораторных (в том числе иммунологических, иммуногистохимических) методов диагностики в оценке латентных форм хронического гепатита В. Описана современная технология комбинированной интерферонзаместительной и интерферониндуктивной противовирусной терапии, обоснована роль индуктора интерфероногенов циклоферона как средства иммунокоррекции, имеющего патогенетическую направленность и расширяющего круг больных хроническим гепатитом В, которым показана этиопатогенетическая терапия.

Ключевые слова: индукторы интерферонов, циклоферон, противовирусная терапия, рекомбинантные интерфероны, гепатит В, ДНК вируса гепатита В, периферические мононуклеары, иммунная система, иммунокоррекция

ВВЕДЕНИЕ

Хронический гепатит В (ХГВ) — широко распространенное заболевание, поразившее треть мировой популяции. Около 350 млн людей имеют признаки хронического заболевания. Несмотря на внедрение вакцинации, летальность, обусловленная последствиями цирротической стадии заболевания, такими как декомпенсированная печеночная недостаточность, гепатоцеллюлярная карцинома, по-прежнему остается высокой, унося ежегодно 500 тыс. — 900 тыс. человеческих жизней.

Основная цель терапии ХГВ — эрадикация вируса и подавление вызванного им некро-воспалительного процесса, что способствует снижению риска цирроза печени, печеночной недостаточности, гепатоцеллюлярного рака, необходимости трансплантации.

На основании взаимоотношений вируса и иммунной системы организма выделяют 4 стадии хронической гепатит В (HBV) инфекции. Первые 2 стадии хронической HBV-инфекции (иммунной толерантности и иммунного клиренса) хорошо изучены и трактуются как HBeAg-позитивный и HBeAg-негативный ХГВ. Для них характерна различная степень активности некро-воспалительного процесса, высокий уровень HBV-ДНК в сыворотке крови. Такие пациенты подлежат противовирусной терапии, в арсенале которой наряду с препаратами рекомбинантных интерфе-

ронов имеется группа препаратов — нуклеотидных аналогов для приема внутрь [7].

У некоторых пациентов с HBV-инфекцией вследствие неполноценности иммунной системы организм не способен эффективно влиять на процессы вирусной репликации; элиминации вируса не происходит. В этом случае некро-воспалительный процесс принимает затяжное рецидивирующее течение, которое может продолжаться десятилетиями, неминуемо приводя к развитию цирроза печени и его осложнений. Латентные формы хронической HBV-инфекции включают понятия “неактивного носительства HBsAg” и “латентной HBV-инфекции”. Термин “латентной HBV-инфекции” (перенесенной HBV-инфекции) предложен для характеристики пациентов, у которых имеются серологические маркеры ХГВ (HBsAB, HBeogAB) при очень низких показателях репликации HBV-ДНК в сыворотке крови (менее 10^3 копий/мл) и ткани печени, отсутствии признаков биохимической и гистологической активности. Исследованиями последних лет установлен факт зависимости между уровнем репликации HBV-ДНК и прогрессированием фиброза, развитием гепатоцеллюлярного рака [7, 8]. Установлена возможность прогрессирования заболевания даже при сывороточном уровне HBV-ДНК 2000 МЕ/мл (10^4 копий/мл) [11].

Несмотря на успехи, достигнутые в последние годы в области лечения больных с ХГВ, более глубокое понимание механизмов патогенеза заболевания и регуляции иммунного ответа способствует развитию новых подходов в диагностике и оптимизации этиопатогенетической терапии. Обнадеживающей перспективой лечения данной категории больных является комбинация

¹ Кафедра внутренних болезней с курсом терапии и нефрологии ФПК (зав. — проф. В. Г. Радченко) ГОУВПО СПбГМА им. И. И. Мечникова, Гепато-билиарный центр СЗФО для больных с заболеваниями печени и желчевыводящих путей, 195067, Санкт-Петербург, пр. Пискаревский, 47.

различных методов ингибирования вирусной репликации и индукции адекватного иммунного ответа.

Об успешном использовании комбинированной противовирусной терапии разнонаправленного действия (с применением сочетаний индукторов интерфероногенеза и нуклеотидных аналогов) при HBeAg-позитивном ХГВ сообщали [3]. Наилучшую переносимость у пациентов при 24-недельном курсе терапии ХГВ показали комбинации “циклоферон + ламивудин” и “циклоферон + интерферон”. Применение различных режимов назначения препаратов рекомбинантных интерферонов и индукторов интерфероногенеза (циклоферона) пациентам с ХГВ способствует не только повышению противовирусного эффекта, но и уменьшению частоты и выраженности побочных явлений [4, 8].

Целью настоящего исследования явилась оценка эффективности комбинированной противовирусной терапии, заключающейся в последовательном проведении заместительной терапии препаратами r-IFN- α перед назначением индукторов интерфероногенеза, в частности, циклоферона при латентных формах ХГВ.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Последовательное применение препаратов ИФН- α и индуктора интерфероногенеза циклоферона заключается в назначении интерферонзаместительной терапии препаратами короткодействующих ИФН- α (реферон, интрона-А, роферона-А и др.) внутримышечно в дозе 3 млн. МЕ 3 раза в неделю в течение 14 – 21 дня с последующей терапией циклофероном на протяжении 10 – 12 недель в дозе 600 мг по схеме (внутри на 1, 2, 4, 6, 8, 11, 14, 17, 20, 23-и сутки, затем 1 раз в 3 – 5 дней). Проводят от 2 до 4 курсов комбинированной терапии.

Короткие курсы (2 – 3 недели) интерферонзаместительной терапии препаратами рекомбинантных интерферонов наряду с активацией внутриклеточных механизмов ингибирования вирусной репликации способствуют повышению функциональной активности клеток-продуцентов эндогенного интерферона (лейкоцитов, макрофагов, фибробластов, эпителиальных клеток), что делает возможным индуцирование синтеза α -, β - и γ -интерферонов последующим назначением индуктора интерфероногенеза циклоферона [5].

Заявляемый способ лечения применялся у 15 больных хроническим HBeAg-негативным вирусным гепатитом В, подписавших информированное согласие и находящихся на лечении в клинике внутренних болезней с курсом терапии и нефрологии ФПК ГОУВПО СПбГМА им. И. И. Мечникова за период 1999 – 2009 гг. Из них мужчины составляли 60 %, женщины — 40 %. Средний возраст больных: 37 ± 9 лет. Группу сравнения составили 15 больных хроническим HBeAg-негативным вирусным гепатитом В, сопоставимых по полу и возрасту, выраженности актив-

ности и стадии фиброзирования в печени, получавших монотерапию циклофероном.

Диагноз верифицировался вирусологически: вирусные антигены HBsAg, HBeAg и антитела к вирусам HBsAb, HBeAb, HBcorIgG, HDVIgG, суммарные антитела к HCV исследовали методом иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью тест-системы ЗАО “Вектор-Бест” III поколения, молекулярно-биологические исследования HBV-ДНК в сыворотке крови и ткани печени.

До и после курса терапии оценивали: клинический анализ крови, биохимические показатели крови (аланинаминотрансфераза, АЛТ, аспаргатаминотрансфераза, АСТ, щелочная фосфатаза, ЩФ, гамма-глутамилтранспептидаза, ГГТП).

Инструментальное исследование предусматривало ультразвуковое исследование (УЗИ) печени, желчного пузыря и желчевыводящих путей, поджелудочной железы, селезенки; фиброгастроуденоскопию (ФГДС) с определением состояния слизистой оболочки пищевода, желудка и двенадцатиперстной кишки, наличия варикозных вен в пищеводе и антральном отделе желудка.

С целью объективной оценки состояния эндогенной системы интерферона в клинической практике используют понятие “интерфероновый статус”, который включает ряд показателей: содержание различных типов ИФН в сыворотке крови (s-ИФН); способность лейкоцитов крови к продукции различных типов ИФН (продукция ИФН- α/β , ИФН- γ). Исследуемым пациентам дополнительно проводили изучение показателей интерфероновый статус в интерфероновой реакции лейкоцитов по модифицированной методике В. Д. Соловьева и Т. А. Бектамирова [6]. Интерфероновый статус в норме характеризуется низкими концентрациями ИФН в сыворотке крови и выраженной способностью лейкоцитов к продукции ИФН в ответ на индукцию [2, 9].

Параметры “интерфероновый статус”

1. *Содержание различных типов ИФН в сыворотке крови (s-ИФН).* У здоровых лиц содержание эндогенного циркулирующего s-IFN не превышает следовых количеств ($3,1 \pm 1,6$ МЕ/мл).

2. *Способность лейкоцитов крови к продукции различных типов ИФН (продукция ИФН- α/β , ИФН- γ).* У здоровых лиц индуцированная продукция ИФН- α/β — $394,3 \pm 36,6$ МЕ/мл; ИФН- γ — $206,3 \pm 26,0$ МЕ/мл.

Пункционную биопсию печени проводили всем пациентам до начала противовирусной терапии и спустя 6 мес после окончания курса лечения под местной анестезией чрескожным методом по Menghini. Для получения гепатобиоптата использовали одноразовый набор Herafix (“Braun”, ФРГ) с внутренним диаметром 1,4 – 1,8 мм и длиной иглы 88 мм. Ткань печени исследовали гистологическими, молекулярно-биологическими, иммуногистохимическими методами.

Оценку структурных изменений печеночной ткани проводили полуколичественным методом с использованием индекса гистологической активности (ИГА) по Knodell в балльной системе: минимальная (1 – 3), низкая (4 – 7), умеренная (8 – 12), выраженная (13 – 18). Стадию фиброза печени оценивали по 4-балльной системе [12], начиная от портального фиброза (I стадия) до цирроза с образованием порто-центральных васкуляризованных септ и нодулярной трансформацией паренхимы печени.

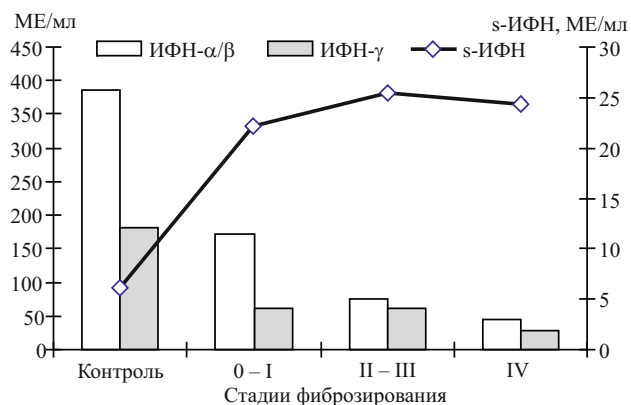
Молекулярно-генетические исследования и секвенирование HBV выполняли в лаборатории генной инженерии ГУ НИИ гриппа РАМН. Для выявления HBV-DNA в сыворотке крови и в исследуемых гепатобиоптатах использовали тест-систему АмплиСенс HBV-470S/ВКО770.

Статистическую обработку данных проводили с использованием непараметрических критериев для проверки гипотезы о различии в независимых и зависимых группах: U-критерий Манна — Уитни, парный t-тест Вилкоксона.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам проведенного исследования у больных ХГВ наблюдается существенный дисбаланс системы интерферона: фоновые показатели сывороточного интерферона сочетаются с резко угнетенной способностью иммунцитов синтезировать интерферон- α/β , интерферон- γ , при чем угнетение интерфероногенеза тем больше, чем выраженнее активность и стадия фиброзирования хронического гепатита (рисунок). В данной ситуации воздействие индукторов интерфероногенеза не способно обеспечить продукцию достаточного количества ИФН, поскольку клетки-продуценты не в состоянии ответить на стимулирующее воздействие.

В этой связи представляется целесообразным больным с установленным ИФН-дефицитом проводить комбинированную противовирусную терапию, заключающуюся в последовательном проведении заместительной терапии препаратами r-IFN- α перед назначением индукторов интерфероногенеза, в частности, циклоферона. Этим обеспечивается достижение прайминг-эффекта, заключающегося в повышении способности клеток-продуцентов синтезировать ИФН.



Состояние системы эндогенного интерферона у больных ХГВ в зависимости от степени фиброза.

Критерии оценки эффективности противовирусной терапии при латентной HBV-инфекции отражены в табл. 1.

Представленные данные в табл. 2 свидетельствуют о том, что после начального курса противовирусной терапии у больных ХГВ происходило снижение показателей сывороточного интерферона (s-IFN), повышение индуцированной продукции IFN- α/β , IFN- γ ; уменьшение проявлений цитолитического, мезенхимально-воспалительного синдромов, в то время как в группе сравнения сохранялись низкие показатели индуцированной продукции IFN- α/β , IFN- γ .

Первичный биохимический ответ и негативация ПЦР HBV-ДНК в ткани печени в основной группе наблюдалась у 86 % больных, а в группе сравнения — у 22 % ($p < 0,05$). Улучшение гистологических показателей в основной группе наблюдалось у 90 % пациентов: уменьшение ИГА по Knodell с 9,4 до 4,1 баллов, уменьшение степени фиброза с 2,6 до 1,2 ($p < 0,05$), в то время как у больных в группе сравнения не выявлено существенных изменений некро-воспалительной активности и стадии фиброирования.

С помощью предложенного способа можно с большей эффективностью по сравнению с монотерапией индукторами интерфероногенеза лечить больных с хроническим HBeAg-негативным вирусным гепатитом В (латентные формы) путем коррекции существующего угнетения системы интерферона препаратами интерферона- α с дальнейшей индукцией синтеза эндогенного интерферона циклофероном [5].

Таблица 1. Критерии оценки эффективности противовирусной терапии при латентной HBV-инфекции

| Критерии | Параметры |
|------------------|--|
| биохимические | Нормализация биохимических параметров, характеризующих: синдром цитолиза (АЛТ, АСТ, билирубин), синдром холестаза (ЩФ, ГГТП), мезенхимально-воспалительный синдром (диспротеинемия, белково-осадочные пробы) |
| иммунологические | Восстановление показателей интерферонового статуса: повышение уровней индуцированной продукции ИФН- α/β , повышение уровней индуцированной продукции ИФН- γ |
| вирусологические | Достижение вирусологического ответа, оцениваемого молекулярно-биологическим методом (ПЦР HBV-DNA) в сыворотке крови (периферических мононуклеарных клетках) и/или ткани печени |

Таблица 2. Клиническая эффективность различных режимов противовирусной терапии при латентных формах ХГВ

| Показатель | Последовательное назначение ИФН- α и циклоферона | | Монотерапия циклофероном | | Достоверность отличий | | | |
|--|---|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------------|------------------|------------------|------------------|
| | до лечения | после лечения | до лечения | после лечения | P ₁₋₃ | P ₁₋₂ | P ₃₋₄ | P ₂₋₄ |
| | M ₁ ± m ₁ | M ₂ ± m ₂ | M ₃ ± m ₃ | M ₄ ± m ₄ | | | | |
| Астеновегетативный синдром, % | 100 | 12 | 100 | 68 | > 0,05 | < 0,05 | > 0,05 | < 0,05 |
| Диспепсический синдром, % | 78 | 22 | 76 | 54 | > 0,05 | < 0,05 | > 0,05 | < 0,05 |
| АЛТ, ЕД/л | 29,24 ± 1,33 | 24,14 ± 1,28 | 29,76 ± 1,96 | 28,50 ± 1,64 | > 0,05 | > 0,05 | > 0,05 | > 0,05 |
| Билирубин, мкмоль/л | 39,12 ± 5,36 | 14,12 ± 4,82 | 38,42 ± 4,18 | 32,12 ± 5,16 | > 0,05 | < 0,05 | > 0,05 | > 0,05 |
| ЩФ, Ед/л | 158,12 ± 14,42 | 118,35 ± 18,44 | 160,24 ± 10,24 | 146,22 ± 9,38 | > 0,05 | > 0,05 | > 0,05 | > 0,05 |
| ГГТП, Ед/л | 46,56 ± 10,12 | 33,16 ± 7,03 | 42,12 ± 6,62 | 40,12 ± 5,38 | > 0,05 | > 0,05 | > 0,05 | > 0,05 |
| Тимоловая проба, ЕД | 6,4 ± 1,2 | 2,5 ± 0,6 | 6,3 ± 1,3 | 5,8 ± 0,7 | > 0,05 | < 0,05 | > 0,05 | < 0,05 |
| Содержание альбуминов, г/л | 51,46 ± 1,68 | 56,32 ± 1,36 | 53,14 ± 2,23 | 55,28 ± 2,14 | > 0,05 | < 0,05 | > 0,05 | > 0,05 |
| Содержание γ -глобулинов, % | 20,18 ± 0,62 | 19,32 ± 1,34 | 21,16 ± 1,12 | 19,04 ± 1,68 | > 0,05 | > 0,05 | > 0,05 | > 0,05 |
| Сывороточный интерферон s-IFN, МЕ/мл | 26,32 ± 2,24 | 15,12 ± 1,18 | 26,45 ± 2,36 | 20,48 ± 3,54 | > 0,05 | < 0,05 | > 0,05 | < 0,05 |
| Индукцированная продукция IFN — α/β , МЕ/мл | 138,11 ± 24,15 | 198,32 ± 14,02 | 140,18 ± 15,22 | 96,38 ± 14,56 | > 0,05 | < 0,05 | < 0,05 | < 0,05 |
| Индукцированная продукция IFN — γ , МЕ/мл | 99,12 ± 13,44 | 136,68 ± 12,23 | 85,76 ± 16,19 | 64,48 ± 10,46 | > 0,05 | < 0,05 | > 0,05 | < 0,05 |
| ИГА, Knodell | 9,4 ± 2,4 | 4,1 ± 1,6 | 9,2 ± 2,3 | 8,5 ± 3,1 | > 0,05 | < 0,05 | > 0,05 | < 0,05 |
| Фиброз, Desmet | 2,6 ± 0,6 | 1,2 ± 0,4 | 2,4 ± 0,7 | 2,2 ± 0,6 | > 0,05 | < 0,05 | > 0,05 | > 0,05 |
| HBV-ДНК, % в ткани печени | 100 | 14 | 100 | 78 | > 0,05 | < 0,05 | > 0,05 | < 0,05 |

Блокирование интерферонами стадии инициации трансляции и разрушение и-РНК вируса обуславливают его универсальный механизм действия при инфекциях, вызванных вирусами с различным генетическим материалом. Синтез интерферонов в клетке сопровождается развитием в ней антивирусного состояния, проявляющегося в активации ферментных систем, из которых наиболее хорошо изучены ферменты: 2 – 5-олигоденилат-синтетаза, eIF-2a протеинкиназа, Мх-белки. Индуцированные ИФН- α/β белки оказывают выраженное иммуномодулирующее действие на макрофаги, НК-клетки, Т- и В-лимфоциты, стволовые клетки костного мозга. ИФН- α повышает экспрессию антигенов гистосовместимости — HLA I класса, Fc γ R, Т-клеточных антигенов и рецепторов, а также других молекул [1].

При применении препаратов короткодействующих интерферонов существуют периоды, когда их концентрация существенно снижается и процессы вирусной репликации преобладают над элиминацией, происходит неизбежное инфицирование новых клеток-мишеней (гепатоцитов, периферических мононуклеаров, клеток выстилки печеночных синусоидов, дендритных клеток и т.д.). В этой связи оправдано сочетанное применение препаратов рекомбинантных интерферонов и

индукторов интерфероногенеза с целью обеспечения стабильных уровней интерферонов, циркулирующих в системном кровотоке, за счет суммации эффектов экзогенно вводимых и эндогенно синтезированных. Конечным результатом такого воздействия на систему интерферона в организме является повышение эффективности противовирусной терапии.

ВЫВОДЫ

1. Последовательное применение интерферониндуктивной и интерферонзаместительной терапии при хроническом гепатите В позволяет индуцировать синтез α -, β - и γ -интерферонов циклофероном, что увеличивает эффективность проводимого лечения.

2. Для оценки общей эффективности лечения следует ориентироваться не только на процессы персистенции вируса, но и на объективные клинико-морфологические показатели течения HBV-инфекции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ф. И. Ершов, *Система интерферона в норме и при патологии*, Медицина, Москва (1996).
2. В. Г. Радченко, В. В. Стельмах, В. К. Козлов, *Оптимизация этиопатогенетической терапии хронического гепатита С*, Тактик-Студио, Санкт-Петербург (2004).

3. Т. В. Сологуб, М. Г. Романцов, С. Н. Коваленко и др., *Вестн. СПбГМА им. И. И. Мечникова*, № 1, 7 – 15 (2006).
4. Т. В. Сологуб, М. Г. Романцов, И. П. Баранов и др., *Вестник СПбГМА им. И. И. Мечникова*, № 2, 7 – 13 (2006).
5. В. В. Стельмах, В. Г. Радченко, В. К. Козлов, 2009118759(025781) РФ от 18.05.2009.
6. В. Д. Соловьев, Т. А. Бектимиров, *Интерфероны в теории и практике медицины*, Медицина, Москва (1981).
7. C. J. Chen, H. I. Yang, J. Su, et al., *JAMA*, **295**, 65 – 73 (2006).
8. G. Chen, W. Lin, F. Shen, et al., *Am. J. Gastroenterol.*, **101**, 1797 – 1803 (2006).
9. Y. F. Liaw, N. Leung, R. Guan, et al., *Hepatology Int*, **2**, 263 – 283 (2008).
10. A. S. Loc, B. J. McMahon, *Hepatology*, **45**, 507 – 539 (2007).
11. M. F. Yuen, H. J. Yuan, D. K. Wong, et al., *Gut*, **54**, 1610 – 1614 (2005).
12. V. J. Desmet, M. Gerber, J. H. Hoofnagle, et al., *Classification of chronic hepatitis: Diagnosis, grading and staging // Hepatology*, 1994, 19. 1523 – 1520.7.

Поступила 14.12.10

POSSIBILITIES OF USING INTERFERON-INDUCTION THERAPY DURING LATENT HBV INFECTION

V. V. Stel'makh

Mechnikov State Medical Academy, Piskarevskii pr. 47, St. Petersburg, 195067, Russia

The article is devoted to the problem of latent hepatitis B virus (HBV) infection, the aspects of etiology, and questions of diagnostics and directions of treatment optimization. Immune violations, developing on the background of disfunction of mononuclear phagocytes of liver and chronic inflammation in a hepatic parenchyma with the elements of autoalteration by immune factors, and their role in latent HBV infection are described. Possibilities of using laboratory (including immunological and immunohistochemical) methods of diagnostics are considered.

Key words: Interferon inducers, cycloferon, antiviral therapy, recombinant interferons, hepatitis B, hepatitis B viral DNA, peripheral mononuclear cells, immune system, immunocorrection