

ИЗУЧЕНИЕ ИНТЕРФЕРОНОГЕННОЙ И ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ПРОТЕФЛАЗИДА У БОЛЬНЫХ С ГЕРПЕСВИРУСНЫМ ПОРАЖЕНИЕМ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

Е.Л. Гошко, С.Л. Рыбалко, В.И. Матяш, В.П. Атаманюк

Институт эпидемиологии и инфекционных болезней имени Л.В. Громашевского АМН Украины, г. Киев

В обширной структуре нейроинфекций герпесвирусное поражение нервной системы занимает особое место как по тяжести клинических проявлений и неблагоприятности прогноза, так и по особенностям морфологических изменений [14]. В настоящее время установлено, что ведущую роль в патогенезе герпесвирусной инфекции (ГВИ) играет иммунная система человека [1-4, 16, 17]. Именно сила и характер противовирусного иммунного ответа определяют тип ГВИ, характер и глубину поражения нервной системы и частоту рецидивов [3, 9, 13, 16]. По результатам многочисленных исследований было установлено, что у больных с рецидивирующим течением ГВИ наблюдаются глубокие нарушения во всех звеньях иммунной системы (клеточном, гуморальном, системе интерферона — ИФН), что приводит к развитию вторичного вирусиндуцированного иммунодефицита и прогрессированию болезни [2, 9, 12, 13, 15]. Так, в клеточном звене иммунитета наблюдается угнетение продукции лимфокинов, цитокинов, увеличение абсолютного количества Т-супрессоров и снижение общего количества CD3- и CD4-лимфоцитов, в системе интерфероногенеза — снижение продукции эндогенного ИФН и "неправильный" спектр ИФН, в виде нарушения физиологической пропорции α - и γ - ИФН в пользу первых [5, 7, 9, 12, 18, 19]. Указанные иммунные нарушения выявляются как при обострении, так и в межрецидивный период. Считается, что в предупреждении реактивации герпесвирусов ведущую роль играют клеточный иммунитет, опосредованный Т-лимфоцитами, и нормальная активность γ -ИФН в сыворотке крови [2, 6, 8, 10, 11, 15]. Следовательно, терапевтическая коррекция иммунных нарушений должна быть направлена именно на эти звенья противовирусного ответа организма человека.

В 2001 г. в Украине появился отечественный препарат протефлазид (№ Р.02.01/02777). Основным механизмом его противовирусного действия является блокирование вирусоспецифических ферментов тимидинкиназы и ДНК-полимеразы. Протефлазид обладает также интерфероногенным действием в отношении α - и γ - ИФН, иммуномодулирующей, антиоксидантной и апоптозомодулирующей активностью.

Описанные свойства протефлазида позволили включить препарат в схемы комплексной терапии больных с ГВИ. При проведении клинических испытаний препарата в 2001-2005 гг. в клинике нашего Института была установлена его терапевтическая эффективность у больных с острой, подострой и хронической ГВИ. В тоже время многие фармакологические механизмы его действия остаются не изученными.

Целью настоящего исследования было дальнейшее изучение влияния протеклаза на иммунный и интерфероновый статус больных с герпесвирусным поражением нервной системы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследовано 68 больных с герпесвирусным поражением нервной системы (мужчин — 27, женщин — 41), в возрасте от 18 до 65 лет (средний возраст $41 \pm 3,4$).

Диагноз устанавливался на основании анамнеза болезни, данных соматоневрологического обследования, результатов инструментальных методов обследования. Этиология устанавливалась путем обнаружения методами ПЦР ИФА маркеров репликативной активности герпесвирусов в крови и/или ликворе. Исследование клеточного и гуморального иммунитета больных проводилось дважды: при поступлении в стационар (до назначения лечения) и по окончании лечения. Объем исследования включал определение количественных показателей Т-(CD3), В-лимфоцитов (CD20), субпопуляций Т-хелперов/индукторов (CD4), Т-супрессоров (CD8), натуральных киллеров (CD16) методом иммунофлуоресцентной микроскопии с использованием набора моноклональных антител производства "Клоноспектр" (Россия). О функциональной активности иммунных клеток судили по показателям пролиферативной активности лимфоцитов в реакции бластной трансформации (РБТП) различными митогенами, цитотоксической активности мононуклеаров (спонтанной и антителозависимой), фагоцитарной активности нейтрофилов (НСТ-тест). Содержание циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) определялся методом селективной преципитации комплексов антиген-антитело с 3,5% раствором лолиэтиленгликоля, уровень аутоиммунных реакций к нейроспецифическим белкам (основному белку миелина — ОБМ, нейроспецифическому антигену — NSE) — методом иммунофлуоресцентного анализа.

Активность ИФН в сыворотке крови исследовали у 17 больных основной группы по схеме: до приема препарата, в 1, 3, 7, 14, 21, 30 и 40 день приема препарата.

Определение активности ИФН в сыворотке крови проводилось по методике подавления цитопатического действия (ЦПД) вируса везикулярного стоматита в культуре клеток МДВК. Вирус везикулярного стоматита (ВВС) — штамм Индиана, был получен из музея вирусов Института вирусологии имени Д.И. Ивановского РАМН (г. Москва). Инфекционный титр вируса в культуре МДВК составлял 4,0-5,0 Ig ТЦД₅₀ - Культивирование ВВС проводили в 2-суточной культуре фибробластов эмбрионов кур по общепринятой методике. Определение инфекционного титра ВВС осуществляли методом конечных разведений. Инфекционные титры вируса определяли в Ig ИД₅₀ — конечное десятикратное разведение вируса, которое в 50% зараженных лунок вызывало специфическую дегенерацию клеток. Культуры клеток в пластиковых планшетах обрабатывали интерферонсодержащей сывороткой больных. Через 18 часов инкубации при 37°C с подачей 5% CO₂ культуральную жидкость удаляли, клетки отмывали

однократно раствором Хэнкса и заражали ВВС с множественностью инфекции 100 ТЦД₅₀. После 30 минутной инкубации в термостате, клетки отмывали и заливали средой RPMI – 1640 с 2% прогретой эмбриональной телячьей сывороткой. Результаты учитывали через 24-48 часов. За титр ИФН принимали число, обратное его наибольшему разведению, вызывающему задержку ЦПД в 50% культур (ИЕ50/мл). Типирование ИФН проводили согласно маркеру кислотоустойчивости. Учитывая тот факт, что α -ИФН является кислотоустойчивым — тип ИФН определяли как α -ИФН в тех случаях, когда активность ИФН без изменения рН и с изменением рН была на одном уровне. Если активность ИФН не определялась после изменения рН, то тип ИФН определяли как γ -ИФН. Если активность ИФН без изменения рН была выше на 2 порядка, чем после изменения рН, то тип ИФН, продуцирующегося клетками, относили α - и γ -ИФН.

В зависимости от проводимой терапия больные были разделены на две группы — основную (35) и группу сравнения (33).

Больным основной группы на фоне базисной патогенетической терапии назначался протефлазид по специально разработанной схеме: по 15 капель 2 раза в день в течение 3 месяцев (1 и 2 день — по 5 капель 2 раза в день, 3-4 дни — по 10 капель 2 раза в день, с 5 дня — по 15 капель 2 раза в день) с постепенным снижением дозы препарата в течение 2 месяцев, с последующей полной отменой. В виде монотерапии протефлазид принимали 18 больных, в сочетании с зовираксом (10-15 мг/кг/сут. 10-14 дней), или цимевеном (5 мг/кг/сут. 10-14 дней) — 17 больных.

В группу сравнения вошли 33 больных, комплексная терапия которых не включала протефлазид. Во время проведения исследования в двух группах из схем терапии были исключены препараты, которые могли бы повлиять на иммунные и интерфероновые показатели.

Полученные данные были обработаны с применением непараметрических статистических методов (критерий Вилкоксона, "U-критерий Манна-Уитни") для анализа количественных признаков в двух зависимых и независимых группах. В количественных показателях описаны меры центральной тенденции и рассеяния для выборок с ненормальным распределением признаков (медиана, "Нижние и верхние квартили").

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При вирусологическом обследовании активная моновирусная инфекция была выявлена у 28 (41,2±6,0)% NSV1/2 – (13,2±4,1)%, CMV – (10,3±3,7)%, EBV – (14,7±4,3)%, ассоциированная герпесвирусная инфекция — у 40 (58,8±6,0)% больных.

По результатам неврологического обследования были выделены такие клинические формы как: арахноэнцефалит — у 31 (45,6±6,1)%, энцефаломиелополирадикулоневрит — у 13 (19,1±4,8)%, рассеянный энцефаломиелит — у 13 (19,3±4,8)%, энцефалит - у 7 (10,3±3,7)%, арахноидит — у 3 (4,4±2,5)%, менингоэнцефалит — у 2 (2,9±2,1)%, полирадикулоневрит — у 1 (1,5±1,5)%. По тяжести течения в исследуемых группах преобладало

среднетяжелое ($63,2 \pm 5,9$)% и тяжелое ($36,8 \pm 5,9$)%. По характеру и длительности болезни хронически рецидивирующее течение наблюдалось у 34 ($50,0 \pm 6,1$)% больных, подострое — у 25 ($36,8 \pm 5,9$)%, острое — у 9 ($13,2 \pm 4,1$)%.

В иммунном статусе больных двух групп при первичном обследовании отмечалось: в количественных показателях — умеренное снижение общего количества лимфоцитов (CD3); в функциональных тестах — повышение спонтанной бластной трансформации Т-лимфоцитов, умеренное снижение показателей антителозависимой цитотоксичности мононуклеаров и индуцированной фагоцитарной активности нейтрофилов в тесте с НСТ (нитросиний тетразолий). Высокими были содержание ЦИК в крови, показатели сенсibilизации нейтрофилов к нейроспецифическим белкам и уровень аутоантител к тканевым антигенам (табл. 1). Выявленные изменения свидетельствуют о развитии вирусиндуцированных иммунных нарушений, которые максимально проявляются в количественной и функциональной недостаточности клеточного звена иммунитета и в нейроаутоиммунных реакциях. Статистически значимых отличий в иммунных показателях больных в обеих группах до начала терапии выявлено не было ($p_t > 0,05$).

При повторном исследовании у всех больных в иммунном статусе наблюдалась положительная динамика в виде снижения содержания ЦИК и показателей сенсibilизации нейтрофилов к нейроспецифическим белкам (ОБМ, NSE).

На фоне терапии протеклазидом у больных основной группы было отмечено статистически значимое ($p_0 < 0,05$) снижение общего количества В-лимфоцитов, и уровня аутоантител к тканевым антигенам (ОБМ). Определено также статистически значимое ($p_0 < 0,05$) повышение показателей спонтанной цитотоксичности мононуклеаров и индуцированной фагоцитарной активности нейтрофилов.

В группе сравнения при повторном исследовании наблюдалось статистически значимое ($p_c < 0,05$) снижение количества натуральных киллеров, повышение функциональной активности В-лимфоцитов в РБТЛ в ответ на стимуляцию липополисахаридом.

Статистически значимых отличий ($p_2 > 0,05$) при повторном обследовании между иммунными показателями больных двух групп выявлено не было, но у больных основной группы по сравнению с группой сравнения, по окончании курса лечения наблюдалось более выраженное увеличение общего количества Т-лимфоцитов (CD3), натуральных киллеров (CD16) и повышение функциональной активности мононуклеаров и нейтрофилов, что свидетельствовало о стабильной тенденции к нормализации клеточного звена иммунитета на фоне терапии.

Динамика активности ИФН в сыворотке крови больных с герпесвирусным поражением нервной системы при применении протеклазида представлена в табл. 2.

В первые сутки после приема протеклазида определялся α - и γ -ИФН. Со 2 по 9 сутки происходил сдвиг активности ИФН в сторону γ -ИФН, а затем с 10 суток

наблюдалось превалирование индукции α - ИФН, которая сохранялась до конца исследования.

Таблица 1

Динамика иммунологических показателей в зависимости от терапии

Иммунологические показатели	N	Основная группа, n= 35							Группа сравнения, n= 33						P ₁	P ₂		
		До лечения			После лечения				P ₀	До лечения			После лечения				P _c	
		Me	Нк	Вк	Me	Нк	Вк	Me		Нк	Вк	Me	Нк	Вк				
Лимфоциты, %	30-36	39,3	35,0	45,0	39,2	34,0	45,0	0,8	40,1	36,0	45,0	39,8	36,0	43,0	0,88	1,0	1,0	
CD -3, %	56-65	52,7	49,0	64,0	56,5	52,0	65,5	0,4	54,9	45,0	59,0	53,8	44,3	63,3	0,64	1,0	1,0	
CD-4, %	25-35	30,4	24,7	34,5	33,2	27,9	35,1	0,1	32,3	25,7	39,1	34,6	29,7	37,8	0,1	1,0	1,0	
CD-8, %	22-26	24,4	21,2	27,6	27,4	21,9	28,9	0,18	27,3	23,6	29,7	27,0	24,1	28,5	0,81	1,0	1,0	
CD-20, %	8-10	12,2	8,3	15,9	10,2	6,9	12,9	0,01	9,7	7,6	12,0	10,5	8,8	12,8	0,36	1,0	1,0	
CD-16, %	17-20	15,2	10,3	18,9	17,9	14,3	19,3	0,12	18,2	12,4	21,4	14,7	11,9	16,8	0,04	1,0	1,0	
Спонтанная пролиф. лимф. в РБТЛ, %	0-2	4,8	2,0	6,0	3,3	2,0	4,0	0,12	5,1	2,0	8,0	4,4	2,0	6,0	0,36	1,0	0,2	
Т-митоген пролиф. лимф., %	55-65	60,2	53,0	68,0	55,1	53,0	62,0	0,13	54,4	48,0	63,0	54,5	51,0	62,0	0,96	1,0	1,0	
Простагландин. завис. пролиф. лимф., %	65-75	69,9	59,0	82,0	62,6	56,0	73,3	0,06	60,8	49,0	76,0	58,1	54,0	64,0	0,61	1,0	1,0	
В-митоген пролиф. лимф., %	30-45	47,0	39,0	56,0	45,1	38,0	54,0	0,13	45,8	32,0	55,0	39,0	31,0	47,0	0,04	1,0	1,0	
Спонт. цитотокс. мононуклеаров, %	26-34	25,0	21,0	32,0	31,5	28,0	34,0	0,03	28,0	25,0	34,0	28,5	25,0	35,0	0,25	1,0	0,1	
Антителозавис. цитотокс. мононуклеаров, %	42-50	35,6	28,0	45,0	41,3	37,0	45,0	0,07	41,6	34,0	51,0	43,8	36,5	49,0	0,83	1,0	1,0	
Спонт. фагоц. акт-ть нейтроф., УЕ	255,0	263,8	228,0	296,5	259,5	245,0	276,0	0,33	256,5	215,8	290,0	255,7	246,0	274,0	0,81	1,0	1,0	
Индук. фагоцит акт-ть нейтрофилов, %	60-70	55,5	50,6	60,7	60,1	56,0	65,4	0,003	57,5	53,1	64,7	58,0	54,5	62,6	0,76	1,0	1,0	
Адгезивная акт-ть нейтрофилов, %	35-55	39,5	32,0	48,0	43,0	34,0	53,0	0,22	41,1	34,0	48,0	39,6	33,0	46,0	0,48	1,0	1,0	
ЦИК, УЕ	70-80	124,3	95,0	150,0	102,6	82,5	120,0	0,02	121,5	95,0	130,0	99,4	80,0	120,0	0,01	1,0	1,0	
Аутоантиген (ОБМ) индуц. пролиф. в РБТЛ, %	0-3	8,4	5,0	12,0	6,7	5,0	10,0	0,1	6,6	6,0	10,0	7,6	6,0	9,0	0,26	1,0	0,2	
Сенсиб. нейтрофилов альбумин, %	5-10	20,4	12,0	31,0	16,3	10,0	16,0	0,07	17,7	8,0	25,0	13,3	8,0	15,0	0,17	1,0	1,0	
Сенсиб. к ОБМ, %	5-7	22,2	11,0	25,0	14,1	8,5	15,5	0,001	25,9	13,0	39,0	16,0	8,0	14,5	0,009	1,0	1,0	
Сенсиб. к NSE, %	3-6	24,4	12,0	31,0	15,0	9,5	14,5	0,003	28,1	12,0	38,0	15,6	8,0	14,5	0,006	1,0	1,0	
ИФА уровень ауто-антител (ОБМ), УЕ	25-27	35,7	35,7	36,7	23,7	21,7	27,8	0,003	29,2	22,7	31,7	25,5	21,9	28,9	0,17	1,0	1,0	

Примечание: Me — медиана, Нк — нижний квартиль, Вк — верхний квартиль, p₀ — в основной группе, p_c — в группе сравнения, P₁ — до лечения, P₂ — после лечения

Динамика активности α - и γ -интерферонов в сыворотке крови у больных с герпесвирусной инфекцией при применении протекфлазида

Время обследования (день)	Тип интерферона			
	pH+		pH-	
	Средний титр (ИЕ ₅₀ /мл)	log±m	Средний титр (ИЕ ₅₀ /мл)	log±m
До введения препарата	1:13,9	(3,8±1,0)	1:97	(6,6±1,1)
1	1:26	(4,7±0,9)	1:69	(6,1±1,6)
2	—	—	1:28	(4,8±0,2)
3	—	—	1:112	(6,9±1,8)
7	—	—	1:91	(6,5±0,7)
10	1:22,6	(4,5±1,7)	1:52	(5,7±0,98)
14	—	—	1:91	(6,5±1,9)
20	1:52	(5,6±1,0)	1:37	(5,3±0,9)
30	1:45	(5,5±2,0)	—	—
40	—	—	1:50	(5,7 ± 1,1)

При анализе взаимосвязи между динамикой активности α - и γ - ИФН и клинико-терапевтической эффективности было установлено, что стойкая положительная неврологическая и соматическая динамика у больных основной группы наблюдалась с 9-10 суток терапии, что совпадало по времени со сдвигом активности ИФН. По нашему мнению, период повышения активности γ - ИФН способствовал быстрой коррекции иммунных нарушений, подавлению репликации вирусов и достижению стабилизации гомеостаза. Дальнейший противорецидивный эффект при длительном применении протекфлазида обеспечивается стабильно повышенной активностью α -ИФН и быстрым нарастанием активности γ -ИФН в случае возобновления репликации герпесвирусов или углубления иммунных нарушений. По нашему мнению, свойство протекфлазида индуцировать γ -ИФН является одним из основных механизмов его антигерпесвирусного действия, а смена индукции различных типов ИФН лежит в основе механизма иммунокоррекции при ГВИ. Важным является также и тот факт, что при ежедневном приеме препарата не было выявлено угнетения активности α - и γ - ИФН, свидетельствующее об отсутствии рефрактерности иммунотропных клеток к индукции ИФН протекфлазидом.

При изучении взаимосвязи между иммунными показателями и динамикой активности ИФН было отмечено, что у больных основной группы, в отличие от группы сравнения, на фоне терапии протекфлазидом наблюдается умеренное повышение количества натуральных киллеров и возрастание функциональной активности мононуклеаров и нейтрофилов, что можно расценивать как следствие действия γ -ИФН на иммунные клетки организма.

Выявленная иммуномодулирующая и интерферогенная активность протекфлазида являются обоснованием для назначения препарата больным с ГВИ:

- в комплексной терапии при тяжелом и среднетяжелом течении герпесвирусного процесса для потенцирования эффекта;

- в виде длительной профилактической (иммунокорректирующей, противовирусной) терапии при рецидивирующем течении ГВИ.

ВЫВОДЫ

1. У больных с герпесвирусным поражением нервной системы наблюдаются вирусиндуцированные иммунные нарушения, которые проявляются в снижении количественных (CD3, CD16) и функциональных показателей клеточного звена иммунитета, в развитии нейроаутоиммунных реакций.

2. При проведении противовирусной терапии у больных обеих групп в иммунном статусе наблюдалась положительная динамика в виде снижения содержания ЦИК в крови и уменьшения сенсibilизации нейтрофилов к нейроспецифическим белкам. При сравнении иммунных показателей больных двух групп на фоне проведения терапии статистически значимых отличий выявлено не было, но у больных основной группы на фоне приема протектлазида отмечалась более выраженная тенденция к нормализации клеточного звена иммунитета (повышение общего числа лимфоцитов (CD3), натуральных киллеров (CD16), функциональной активности мононуклеаров и нейтрофилов), что прогностически благоприятно.

3. Динамика индукции интерферонообразования при лечении больных ГВИ характеризовалась превалированием активности γ -ИФН со 2 суток по 9 приема препарата, с последующим повышением α -ИФН на 10 сутки. Время интерфероноконверсии совпадает со сроками наступления положительной клинической динамики.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баринский И.Ф., Шубладзе А.К. Герпес: этиология, диагностика, лечение. — М.: Медицина, 1986. — 296с.
2. Герпес: патогенез и лабораторная диагностика /В.А. Исаков, В.В. Борисова и др. // Руководство для врачей. — СПб: Издательство Лань, 1999. —192 с.
3. Герпетический иммунодефицит как условие развития генерализованного патологического процесса, (редакционная заметка) // Вопросы вирусологии. — 1990. —№6. -С. 524-526.
4. Драник Г.Н. Клиническая иммунология и аллергология — М.: ООО Медицинское информационное агентство, 2003. - 604 с.
5. Ершов Ф.И. Система интерферона в норме и при патологии. - М.: Медицина, 1996. — 240 с.
6. Завелевич М.П., Деев В.А., Рыбалко С.Л. Современные представления о системе интерферона// Лаб. диагностика. — 2004.—№4.—С. 65-72.
7. Интерфероновый статус и эффект противовирусной терапии с использованием индукторов интерферона у женщин с привычным выкидышем в анамнезе, хронической смешанной вирусной инфекцией в сочетании с аутоиммунными реакциями/ А.В. Борисова, В.М. Сидельникова, Г. Т. Сухих, Н.С. Логинова // Вестник Российской ассоциации акушеров-гинекологов. — 1998.-№4. -С. 15-19.

8. Малашенкова И.К., Тазулахова Э.Б., Дидковский Н.А. Интерфероны и их индукторы // Терапевт. арх. — 1998. -N11. - С. 35-39.
9. Роль системы естественной цитотоксичности в иммунопатогенезе рецидивирующей герпетической инфекции и влияние иммуномодуляторов на клинико-иммунологический статус / А.М. Борисова, А.Б. Алкеева, М.З. Саидов и др. // Иммунология. — 1991. — N6-С. 60-62.
10. Руководство по иммунофармакологии: Пер. с англ. / Под ред. М.М. Дейла, Дж.К. Формена. —М.: Медицина, 1998. — 332 с.
11. Сапин М.Р. Этинген Л.Е. Иммунная система человека. — М.: Медицина, 1996. — 304 с.
12. Состояние вегетативной и иммунной систем у инфицированных вирусом простого герпеса/О.А. Малышева, В.С. Ширинский, В.С. Кожевников, Н.М. Старостина // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2001.-N3.- С 37-40
13. Сухих Г.Т., Ванько Л.В., Кулаков В.И. Иммуитет и генитальный герпес // НЦФГи П РАМН, 1997; Н. Новгород-Москва.
14. Хахалин Л.Н., Соловьева В.В. герпесвирусные заболевания челолвека // Клиническая фармакология и терапия.-1998. - № 1 – С. 72-78.
15. Чиркин В.В., Семенов В.Ф., Карандашов В.И. Вторичные иммунодефициты. – М: Медицина, 1999. – 248 с.
16. Annunziato P.W., Gershon A. HSVinfection // Pediatr in Review 1996. – Vol. 17(12). – P. 415-424.
17. Fraser N.W., Valiy-Nagy T. Viral, neuronal and immune factors which can influence HSV latency and reactivation // Microb.Pathog. –1993. Vol. 15. – P. 83-91.
18. Herrath M.G., Oldston MBA. Virus-induced autoimmune disease // Current Opinion in immunol. – 1996. Vol. 8. – P. 878-885.
19. Shornik J.K., Black M.M. Secondary autoimmune disease in herpes gestations // J.Am. Acad. Dermatol. – 1992. - Vol. 26. – P. 563-566.

Журнал «Лабораторная диагностика» 4 (34) 2005 г. стр. 30-35