

НОВЫЙ ПРЕПАРАТ В ЛЕЧЕНИИ ХРОНИЧЕСКОГО ГЕПАТИТА С (ЧАСТЬ II)

И.В. Болтина

Институт экогигиены и токсикологии им. Л.И. Медведя МОЗ Украины

А.Д.Вовк, И.В.Соляник

Институт эпидемиологии и инфекционных заболеваний им. Л.В.Громашевского АМН Украины

Е.М. Корнилина, А.Н.Николаенко

НПЦ “ЭРБИС”, г. Киев.

Хронические вирусные поражения печени остаются серьезной проблемой современной гепатологии [1]. Хронический гепатит С (ХГС) – распространенное заболевание, для которого характерно, как правило, малосимптомное течение, при этом гистологические изменения в ткани печени могут приводить к циррозу печени и первичной гепатокарциноме [2, 3, 6]. В патогенезе поражения органов при HCV-инфекции обсуждаются прямой цитопатический эффект вируса, его участие в повреждении генетического материала клетки и способность вызывать мутационный процесс. Повреждение генетического аппарата при вирусных гепатитах может быть обусловлено интеграцией вирусного генома в геном гепатоцитов. Особенностью вируса гепатита С является то, что он обладает высокой генетической вариабельностью и является мощным индуктором онкогенеза без встраивания вируса в хромосомы больного [4]. Следует отметить, что при острой вирусной инфекции в клетках возникает быстрое и массовое повреждение хромосомного аппарата и инфицированные вирусом клетки дегенерируют, не оставляя жизнеспособного потомства, а при хронической инфекции вирус оказывает истинное мутагенное действие, поскольку репарация успевает исправить одну часть изменений собственной ДНК клетки, а другую часть перевести в потенциальные мутации или хромосомные aberrации [5].

По изменению генетического аппарата клеток различают три типа мутаций: генные – изменение структуры гена, хромосомные – изменение структуры хромосом (aberrации хромосом), геномные – изменение числа хромосом (анеу- и полиплоидия). В процессе индуцированного вирусом мутагенеза между этими мутациями существует определенная положительная корреляция, поскольку мутации обусловлены сложными взаимодействиями репликации ДНК, рекомбинации и случайных ошибок в работе репарационных систем.

На выраженность мутагенного действия вируса в значительной мере влияет состояние иммунной системы, контролирующей генетический гомеостаз организма. Действие иммуни-

тета распространяется на сам вирус и мутированные клетки, если они несут признаки генетической чужеродности для данного организма.

В связи с этим важное значение приобретают лекарственные средства, регулирующие репликативность вируса в организме и повышающие иммунитет. Особенный интерес вызывает применение в комплексном лечении ХГС отечественного препарата ЭРБИСОЛ[®] УЛЬТРАфарм (производства ООО “ЭРБИС”), который оказывает иммуномодулирующее, противовирусное действие [7], является метаболическим антимуагеном и обладает способностью предупреждать возникновение изменений в геноме человека и обеспечивать его стабильность [8].

Целью исследования явилось изучение хромосомного аппарата в культуре лимфоцитов периферической крови у больных хроническим гепатитом С (ХГС) в динамике лечения препаратом ЭРБИСОЛ[®] УЛЬТРАфарм.

Материал и методы исследования. В исследование было включено 52 пациента (36 мужчин и 16 женщин, средний возраст $39,5 \pm 3,8$ лет), которые находились на лечении в отделе вирусных гепатитов Института эпидемиологии и инфекционных заболеваний им. Л.В.Громашевского АМН Украины. Все больные были разделены на две группы: основную (32 пациента) и контрольную (20 пациентов). Диагноз ХГС выставлялся на основе серологических показателей (уровня антител IgG и IgM к гепатиту С – анти-HCVcore Ag, NS4, NS5) и определения RNA-HCV методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Пациенты основной и контрольной групп получали базовую терапию, которая включала гепатопротекторы и дезинтоксикационные средства (в/в: глюкозу, рибоксин, физиологический раствор, аскорбиновую кислоту). Пациенты основной группы дополнительно получали препарат ЭРБИСОЛ[®] УЛЬТРАфарм ежедневно внутривенно по 2 мл 2 раза в сутки (утром и вечером) в течение 20 дней. Лечение проводилось в 3 курса: 1-й курс – 20 дней, потом перерыв 1 месяц, 2-й курс лечения – 20 дней, снова перерыв 1 месяц и 3-й курс – 20 дней. Забор крови проводили до лечения, на 20-й, 70-й и 120-й день лечения. Контролем для обеих групп была кровь 20 практически здоровых доноров соответствующего возраста.

Лимфоциты периферической крови культивировали согласно общепринятому методу Хангерфорда [9] на протяжении 52 часов с модификациями [10], что позволяло исследовать клетки первого митоза. Отбор метафазных пластинок для цитогенетического анализа, классификация и метод подсчета aberrаций хромосом были общепринятыми [11, 12], анеуплоидные клетки подсчитывали в модификации Болтиной И.В. [13]. Для цитогенетического

анализа использовали метафазные пластинки без перекрещиваний хромосом, которые содержали 46 ± 2 хромосомы – для фоновой частоты aberrаций и от 24 до 93 хромосом – для количества анеуплоидных клеток. Учитывали aberrации хроматидного и хромосомного типов. Пробелы отмечали, но в число aberrаций не включали. Проводили анализ зашифрованных препаратов, окрашенных рутинным методом.

Статистическую обработку результатов проводили на персональном компьютере с использованием программы “Microsoft Excel”. Достоверность отличий рассчитывали с учетом *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. Результаты исследования хромосомного аппарата лимфоцитов периферической крови у больных ХГС основной и контрольной групп до и в динамике лечения после трех курсов терапии представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Данные цитогенетического анализа хромосом лимфоцитов периферической крови больных ХГС в динамике лечения ($M \pm m$).

Показатель	Сроки наблюдения	Практически здоровые доноры	Больные ХГС	
			Основная группа	Контрольная группа
Частота метафаз с aberrациями, %	до лечения	$1,7 \pm 0,2$	$17,2 \pm 0,80 *$	$18,4 \pm 0,76 *$
	после 1-го курса лечения		$13,3 \pm 0,46 * **$	$14,0 \pm 0,65 * **$
	после 2-го курса лечения		$5,7 \pm 0,35 * ** \nabla$	$10,4 \pm 0,68 * **$
	после 3-го курса лечения		$4,9 \pm 0,35 * ** \nabla$	$8,6 \pm 1,00 * **$

Примечание: * - достоверные отличия по сравнению с группой здоровых доноров ($P < 0,05$), ** - достоверные отличия по сравнению с данными до лечения ($P < 0,05$), ∇ - достоверные отличия по сравнению с показателями больных контрольной группы ($P < 0,05$).

У обследованных больных ХГС обеих групп до лечения была зарегистрирована повышенная частота aberrаций хромосом в лимфоцитах периферической крови по сравнению с таковой в группе здоровых доноров. Это согласуется с результатами обследования больных с вирусными гепатитами В и С [14], у которых была обнаружена частота aberrаций хромосом в лимфоцитах периферической крови, равная 15,3 % - при гепатите С и 11,1 % - при гепатите В. Цитогенетические нарушения могут быть обусловлены патогенетическими механизмами персистенции вирусов в организме, метаболической и иммунологической реактивностью больных, поскольку изменения в хромосомном аппарате могут быть не только результатом

прямого “вирус-токсического” действия, но и реакцией организма на введение чужеродного антигена [15].

После 1-го курса лечения у больных ХГС как основной, так и контрольной групп отмечалось одинаковое снижение по сравнению с исходными данными частоты aberrаций хромосом лимфоцитов. После 2-го курса лечения наблюдалось дальнейшее уменьшение частоты aberrаций хромосом лимфоцитов в обеих группах обследованных больных ХГС, но у пациентов основной группы это снижение было более заметным и достоверно отличалось от показателей больных контрольной группы. После 3-го курса терапии отмечено незначительное снижение частоты aberrаций хромосом по сравнению с предыдущим курсом, что свидетельствует о стабилизации полученных показателей, хотя среднестатистические данные в основной группе все больше отличаются от показателей контрольной группы. Спектр aberrаций хромосом у больных ХГС представлен в таблице 2.

Таблица 2 - Спектр aberrаций хромосом у больных ХГС в динамике лечения.

Группы	Дни наблюдения	Аберрации							
		Хроматидного типа				Хромосомного типа			
		Одиночные фрагменты		Обмены		Парные фрагменты		Другие (ацентрические кольца, дицентрики)	
		%	на 100 кл.	%	на 100 кл.	%	на 100 кл.	%	на 100 кл.
Основная	до леч.	89,9	21,8	3,1	3,1	6,8	1,66	0,2	0,04
	после 1-го курса	90,1	17,2	3,2	0,1	7,9	1,52	0,2	0,04
	после 2-го курса	87,8	5,9	0,1	0	11,9	0,79	0,3	0,02
	после 3-го курса	87,3	4,8	1,2	0	12,7	0,70	0	0
Контрольная	до леч.	92,7	24,5	0	3,2	7,3	1,93	0,6	0,15
	после 1-го курса	89,8	17,9	0	1,2	8,8	1,76	0,2	0,03
	после 2-го курса	90,2	12,3	0	0	9,8	1,33	0	0
	после 3-го курса	92,0	10,6	0	0	8,0	0,92	0	0
Здоровые доноры		60,0	1,04	4	0,06	36	0,62	0	0

Из данных таблицы видно, что у пациентов обеих групп (до лечения, после 1-го, 2-го и 3-го курсов лечения) преобладают абберрации хроматидного типа, среди которых преимущество составляли одиночные ацентрические фрагменты. В процессе лечения уменьшается количество различных типов повреждений хромосом по сравнению с данными до лечения. Обмены, ацентрические кольца и дицентрики “исчезали” в обеих группах больных ХГС после 2-го курса терапии.

Еще один из цитогенетических показателей, на который необходимо обратить внимание – наличие мультиабберрантных клеток (метафаз, в которых повреждено более двух хромосом). Существует ряд мнений относительно возникновения мультиабберрантных клеток (МАК): 1) выход энзимов из поврежденных бактерий, которые не протеолизуются в цитоплазме и, достигая ядра, вызывают многочисленные повреждения [16]; 2) мутагенные факторы (и внутренние и внешние) вызывают изменения, как на хромосомном, так и на генном уровне, при этом повреждаются группы генов, принимающие участие в системе репарации и репликации ДНК. Кроме того, абберрации могут возникать не в одном, а в нескольких локусах, что приводит к множественным повреждениям [17]. Наличие МАК может вызывать активацию протоонкогенов и развитие опухолевого процесса [16].

Степень повреждения типа разрывов, массовых фрагментаций и пульверизации хромосом зависит от длительности вирусного инфицирования и времени вирусной репликации [5]. Феномен пульверизации является следствием влияния на интерфазное ядро активизированной ферментной системы митотического ядра, причем случайность в частоте повреждений отдельных хромосом и их частей зависит не от вируса, а от состояния самой хромосомы и ее локусов. Вирус в этих условиях является индуктором цепи событий, которые приводят к тяжелым и массовым повреждениям хромосомного материала. При этом репаративные механизмы инфицированных клеток оказываются не в состоянии исправить повреждения, которые проявляются в виде множественных разрывов хромосом. Количество мультиабберрантных клеток у больных ХГС представлено в таблице 3.

Анализ данных, представленных в таблице 3, показал практически одинаковое количество МАК в обеих группах больных ХГС до лечения и после 1-го курса проведенной терапии. После 2-го и 3-го курсов лечения наблюдалось небольшое снижение МАК у пациентов контрольной группы и статистически достоверное снижение этих клеток у больных, которым был назначен препарат ЭРБИСОЛ[®] УЛЬТРАфарм, что указывает на то, что у больных основной группы восстанавливаются процессы репарации клетки и поврежденные клетки

могут легко элиминироваться. Кроме того, повышение репаративных систем приводит к исключению вируса из клеточной ДНК и восстановлению функционирования последней, в результате чего клетка возвращается к исходному типу.

Таблица 3 - Количество мультиаберрантных клеток у больных ХГС в динамике лечения ($M \pm m$).

Показатель	Сроки наблюдения	Практически здоровые доноры	Больные ХГС	
			Основная группа	Контрольная группа
Частота мультиаберрантных клеток (МАК), %	до лечения	$1,6 \pm 0,4$	$43,0 \pm 1,0$ *	$43,6 \pm 0,98$ *
	после 1-го курса лечения		$42,7 \pm 0,68$ *	$43,5 \pm 0,92$ *
	после 2-го курса лечения		$19,4 \pm 0,60$ * ** ▽	$34,6 \pm 1,00$ * **
	после 3-го курса лечения		$13,8 \pm 0,57$ * ** ▽	$38,8 \pm 1,90$ * **

Примечание: * - достоверные отличия по сравнению с группой здоровых доноров ($P < 0,05$),

** - достоверные отличия по сравнению с данными до лечения ($P < 0,05$), ▽ - достоверные отличия по сравнению с показателями больных контрольной группы ($P < 0,05$).

Необходимым условием нормальной жизнедеятельности соматической клетки является сохранение диплоидного хромосомного набора. Этот процесс обеспечивается специальной генетической программой, направленной на предупреждение преждевременного расхождения хромосом – основной причины образования анеуплоидного кариотипа клетки [18], поэтому уровень анеуплоидии отражает состояние клеточного гомеостаза и может быть использован для оценки резервных возможностей организма [19]. На сегодня установлена корреляционная связь между общим количеством аберрантных (метафаз с нарушениями в хромосомах) и анеуплоидных клеток (увеличение числа хромосом в клетке не отвечает их точному числу в гаплоидном наборе n , например: $2n \pm 3$, $2n \pm 4$), количеством и характером клонов аномальных клеток в лимфоцитах периферической крови, типом и стадией опухолевого процесса [20]. Таким образом, увеличенное количество анеуплоидных клеток может свидетельствовать о возникновении изменений в геноме человека, а именно, о его нестабильности.

Количество анеуплоидных клеток у больных основной и контрольной групп до лечения превышало норму и после 1-го курса лечения (20 дней) практически не менялось. После 2-го и 3-го курсов лечения отмечалось достоверное снижение количества анеуплоидных клеток по

сравнению с данными до лечения у больных основной группы на 32,0 % и 36,7 %, соответственно. При этом была выявлена статистически достоверная разница между показателями больных контрольной и основной групп. У больных контрольной группы такой положительной динамики не отмечено.

Таблица 4 – Количество анеуплоидных клеток в культуре лимфоцитов периферической крови у больных ХГС в динамике лечения ($M \pm m$).

Показатель	Сроки наблюдения	Практически здоровые доноры	Больные ХГС	
			Основная группа	Контрольная группа
Количество анеуплоидных клеток, %	до лечения	$7,9 \pm 0,45$	$16,9 \pm 0,79$ *	$16,0 \pm 0,79$ *
	после 1-го курса лечения		$14,4 \pm 0,48$ * **	$15,4 \pm 0,88$ *
	после 2-го курса лечения		$11,5 \pm 0,48$ * ** ▽	$14,6 \pm 0,77$ *
	после 3-го курса лечения		$10,7 \pm 0,56$ * ** ▽	$14,0 \pm 1,4$ *

Примечание: * - достоверные отличия по сравнению с группой здоровых доноров ($P < 0,05$),

** - достоверные отличия по сравнению с данными до лечения ($P < 0,05$), ▽ - достоверные отличия по сравнению с показателями больных контрольной группы ($P < 0,05$).

Таким образом, присоединение препарата ЭРБИСОЛ® УЛЬТРАфарм к базисной терапии способствовало снижению количества aberrантных, мультиaberrантных и анеуплоидных клеток, что может свидетельствовать об уменьшении мутагенного действия на генетический аппарат лимфоцитов периферической крови и повышению репаративных систем клеток. Проведение уже двух курсов лечения препаратом ЭРБИСОЛ® УЛЬТРАфарм приводило к более заметному положительному эффекту по сравнению с базисной терапией.

Выводы.

1. У больных ХГС обнаруживается повышенная частота aberrаций хромосом в лимфоцитах и значительное увеличение количества мультиaberrантных и анеуплоидных клеток.
2. После двух курсов лечения больных ХГС препаратом ЭРБИСОЛ® УЛЬТРАфарм наблюдалось достоверное снижение частоты aberrаций хромосом и стабилизация этого показателя после третьего курса.
3. После второго и третьего курсов лечения больных ХГС препаратом ЭРБИСОЛ® УЛЬТРАфарм наблюдалось статистически достоверное снижение мультиaberrантных кле-

ток в культурі лимфоцитів периферической крові, що може свідечувати о стабілізації їх генома.

4. У больних ХГС, котріє получали препарат ЕРБІСОЛ[®] УЛЬТРАфарм, отмечалось достоверное уменьшение количества анеуплоидных клеток уже после 1-го курса лечения.

Литература.

1. Рахманова А.Г., Яковлев А.А., Виноградова Е.Н. и др. Хронические вирусные гепатиты (вопросы классификации и регистрации) // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 1999. - № 1. – С. 38-42.
2. Вовк А.Д. Проблема лікування хворих на хронічні вірусні гепатити // Вирусные гепатиты с парентеральным механизмом передачи возбудителей и их исходы. Киев, 2001.– С. 244-248.
3. Вовк А.Д., Громашевська Л.А., Сергеева Т.А. і др. Проблеми хронічного гепатиту С сьогодні // Вірусні хвороби. Токсоплазмоз. Хламідіоз. Матеріали науково-практичної конференції і пленуму Асоціації інфекціоністів України. Тернопіль, 2004.– С. 32-34.
4. Kasai Y., Takeda S., Takagi H. Pathogenesis of hepatocellular carcinoma: a review from the viewpoint of molecular analysis // Semin. Surg. Oncol. – 1996. - № 12 (3). – P. 155-159.
5. Бужиевская Т.И. Вирус-индуцированный мутагенез в клетках млекопитающих / Киев: Наукова думка, 1984. – 133 с.
6. Вовк А.Д. Вірусні гепатити. Клінічні аспекти // СЕС. Профілактична медицина. – 2004. – С. 36 – 41.
7. Николаенко А.Н. Концептуальные подходы в разработке высокоэффективных лекарственных препаратов нового поколения класса “ЭРБИСОЛ УЛЬТРАфарм” // Фармакологічний вісник. – 1998. – № 6. – С. 69– 74.
8. Болтіна І.В., Ніколаєнко О.М. Вивчення активності препарату ЕРБІСОЛ[®] УЛЬТРАфарм в тесті на індукцію аберацій хромосом в культурі лімфоцитів периферичної крові людини in vitro з метаболічною активацією та без неї // Ліки.- 2004.- № 5-6.- С. 111-118.
9. Hungerford D.A. Leukocytes cultured from small inoculate of whole blood and preparation metaphases chromosomes by treatment with hypnotic KCl // Stain Tech. - 1965. - Vol. 40. - P. 333-338.
10. Болтина И.В., Кравчук А.П. Метод изучения мутагенной активности веществ (метафазного анализа абераций хромосом в культуре лимфоцитов периферической крови челове-

ка) *in vitro* с метаболической активацией // Свідоцтво про державну реєстрацію прав автора на твір. - ПА № 4301. – 2001.

11. Evans.H.J Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen test // Handbook of mutagenicity test procedures, second edition. Elsever Sci.Pub. -1984. - P. 405-427.

12. Захаров А.Ф., Бенюш В.А., Кулешов Н.П. и др. Хромосомы человека: Атлас. - М: Медицина, 1982. - 264 с.

13. Болтина И.В. Метод подсчета анеуплоидных клеток при метафазном анализе аберраций хромосом в культуре лимфоцитов периферической крови человека // Свідоцтво про державну реєстрацію прав автора на твір. - ПА № 8745. – 2003.

14. Барияк И.Р., Фролов В.М., Пирский Л.Л. и др. Цитогенетические нарушения у больных хроническими гепатитами В и С // Цитология и генетика . – 2000. – Т. 34, № 4. – С. 3-5.

15. Фролов А.К. Некоторые закономерности цитогенетических изменений в лимфоцитах периферической крови у детей, иммунизированных против оспы и паротита // Цитология. – 1979. – Т. XXI, № 2. – С. 202 – 206.

16. Знаєвська І.А. Особливості цитогенетичного ефекту в лімфоцитах периферійної крові дітей, які зазнали впливу деяких мутагенних факторів фізичної та хімічної природи малої інтенсивності: дисертація ... к-та. мед. наук. – К., 1997. - 146 с.

17. Монахов А.С. Раннее выявление опухолевых заболеваний по цитогенетическим критериям, определяемым в лимфоцитах периферической крови (на примере рака желудочно-кишечного тракта у человека) // Вопросы онкологии. – 2001. – Т. 47, № 4. – С. 401-407.

18. Фролов А.Ф., Дядюн С.Т. Изучение структуры хромосом клеток в условиях их трансформации / В кн.: Вопросы онкогенетики. Киев: Здоров'я. – 1975. – С.105-108.

19. Акопян Г.Р. Аномальне розходження хромосом при гемобластозах у дітей // Тези доп. наук.-практ. конф. Проблеми онкогенетики: наукові та прикладні аспекти. – Київ, 2002. – С. 4.

20. Monakhov A., Gulyaev A., Savoshkina I. et al. Medicogenetic and cytogenetic study of a family with high predisposition to malignant diseases in gastrointestinal tract // J. Exp. Clin. Cancer Res. – 1997. – Vol. 16. – P. 385 – 388.

НОВИЙ ПРЕПАРАТ В ЛІКУВАННІ ХРОНІЧНОГО ГЕПАТИТУ С (ЧАСТИНА II)

Болтіна І.В., Вовк А.Д., Солянік І.В., Корніліна О.М., Ніколаєнко О.М.

В статті наведено результати дослідження стану хромосомного апарату лімфоцитів периферичної крові у 52 хворих на хронічний гепатит С (ХГС) в динаміці базисного лікування із застосуванням перпарату ЕРБІСОЛ[®] УЛЬТРАфарм. В групі хворих, яким до базисної терапії був включений препарат ЕРБІСОЛ[®] УЛЬТРАфарм, спостерігалось покращення стану хромосомного апарату, а саме зниження частоти аберацій хромосом, кількості мультиаберантних та анеуплоїдних клітин вже після другого курсу терапії. Після третього курсу відмічено подальше покращення показників або їх стабілізація.

Ключові слова: хронічний гепатит С, генетичний апарат лімфоцитів, ЕРБІСОЛ[®] УЛЬТРАфарм.

NEW PREPARAT IN TREATMENT OF CHRONIC HEPATITIS C (PART II)

Boltina I.V., Vovk A.D., Solyanik I.V., Kornilina E.M., Nikolayenko A.N.

In the article are represented investigation results of chromosomes apparatus state in peripheral blood lymphocytes in 52 patients with chronic hepatitis C infection (CHC) by treatment ERBISOL[®] ULTRApHarm. In patients using basic therapy with ERBISOL[®] ULTRApHarm were observed an improvement of chromosomes apparatus state – decrease of chromosomes aberrations frequency, quantity of multiaberrant and aneuploidy`s cells after second therapy course. After 3^d therapy course was marked further improvement indexes or their stabilization.

Key words: chronic hepatitis C infection, genetic apparatus of lymphocytes, ERBISOL[®] ULTRApHarm.