

## НОВЫЙ ПРЕПАРАТ В ЛЕЧЕНИИ ХРОНИЧЕСКОГО ГЕПАТИТА С

Е.М.Корнилина, А.Н.Николаенко

НПЦ “ЭРБИС”, г. Киев.

А.Д.Вовк, И.В.Соляник

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

А.Д.Базыка

Научный центр радиационной медицины АМН Украины

Вирусные гепатиты рассматриваются ВОЗ как серьезная проблема современного здравоохранения, которая обусловлена глобальным распространением, часто длительным и тяжелым течением, неблагоприятными близкими и отдаленными последствиями. Вирусный гепатит С занимает особое место. В мире инфицировано HCV 500 млн. человек, то есть 10 % всей популяции. Большинство из них являются скрытыми носителями [2, 3], у которых патологический процесс протекает по типу медленной инфекции и часто приводит к формированию цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы. У 85 % заболевших гепатитом С развивается хроническая (персистирующая) HCV-инфекция, при которой вирус размножается в организме в течение десятков лет. В патогенезе поражения органов при HCV-инфекции обсуждаются прямой цитопатический эффект вируса и вызванные им иммунологические реакции, обуславливающие повреждение печени и других органов и тканей: репликация вируса вне печени – в тканях лимфоидного и нелимфоидного происхождения. Размножение вируса в иммунокомпетентных клетках (лимфоцитах) приводит к нарушению их иммунологической функции.

Лечение вирусного гепатита С - один из самых сложных и не всегда успешно решаемых вопросов в медицине. Эффективность лечения данного заболевания может быть оценена только в конце курса терапии. Часто патогенетическое лечение хронического вирусного гепатита С (ХГС) не обеспечивает профилактики хронизации заболевания. Среди этиотропных препаратов особую роль играют препараты интерферонового ряда, которые запускают сложный каскад иммунологических реакций в организме, в результате чего осуществляется противовирусное, противифибротическое и противоканцерогенное влияние. Однако только у ограниченного количества пациентов, которым назначали монотерапию препаратами интерферона, достигается стойкое улучшение. Кроме того, комплексное исследование показателей клеточного и гуморального иммунитета у больных ХГС показало, что интерферонотерапия вызывает нарушения клеточного звена иммунитета (снижение Т-лимфоцитов, Т-хелперов, дисбаланс цитокинов), что свидетельствует о

развитии вторичного Т-клеточного иммунодефицита на фоне интерферонотерапии и риск его возникновения возрастает по мере увеличения дозы получаемого интерферона и длительности лечения [5]. В связи с этим большое значение приобретают лекарственные средства, которые не только способны регулировать репликативность вируса в организме, но и способствуют повышению иммунитета. Поскольку центральную роль в элиминации вируса играет Т-клеточное звено иммунитета, а основными молекулами, которые обеспечивают процесс межклеточных коммуникаций при иммунном ответе являются цитокины, особенный интерес вызывает применение иммуномодулирующей терапии в комплексном лечении ХГС с использованием отечественного препарата ЭРБИСОЛ<sup>®</sup> УЛЬТРАфарм (производства ООО “ЭРБИС”).

Препарат ЭРБИСОЛ<sup>®</sup> УЛЬТРАфарм представляет собою небелковый низкомолекулярный комплекс природных органических соединений негормональной природы, полученных из животной эмбриональной ткани, содержит гликопептиды, пептиды, нуклеотиды, аминокислоты. ЭРБИСОЛ<sup>®</sup> УЛЬТРАфарм оказывает иммуномодулирующее и противовирусное действие: способствует нормализации нарушенного иммунного статуса вследствие активации Т-лимфоцитов, Th1-хелперов, Т-киллеров и ингибиции активности Th2-хелперов, что важно для восстановления баланса между клеточным и гуморальным иммунитетом, индуцирует синтез  $\alpha$ -;  $\beta$ -;  $\gamma$ -интерферонов, которые способствуют ускорению элиминации вируса [6, 8]. В то же время, активируя процессы регенерации печени, препарат способствует замещению погибших гепатоцитов здоровыми, что позволяет отнести ЭРБИСОЛ<sup>®</sup> УЛЬТРАфарм к препаратам, которые уменьшают степень тяжести инфекционного заболевания.

**Целью** данного исследования было изучение фенотипа иммунокомпетентных клеток у больных ХГС в динамике лечения препаратом ЭРБИСОЛ<sup>®</sup> УЛЬТРАфарм.

**Материал и методы исследования.** В исследование было включено 31 пациент (22 мужчин и 9 женщин, средний возраст  $39,2 \pm 2,6$  лет), которые находились на лечении в отделе вирусных гепатитов Института эпидемиологии и инфекционных заболеваний им. Л.В.Громашевского АМН Украины. Диагноз ХГС выставлялся на основе серологических показателей (уровня антител IgG и IgM к гепатиту С – анти-HCVcor Ag, NS4, NS5) и определения RNA-HCV методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Больные ХГС получали препарат ЭРБИСОЛ<sup>®</sup> УЛЬТРАфарм ежедневно внутривенно по 2 мл 2 раза в сутки (утром и вечером) в течение 20 дней. Лечение проводилось в 4 курса: курс лечения – 20 дней с препаратом, между курсами - перерыв 1 месяц. Контролем служили 20 практически здоровых доноров соответствующего возраста.

Иммунологическое исследование, которое было проведено в отделе клинической иммунологии НЦРМ АМН Украины, включало определение количества клеток периферической крови с антигенными детерминантами CD3<sup>+</sup> (общее количество Т-лимфоцитов); CD4<sup>+</sup> (Т-лимфоциты хелперы); CD8<sup>+</sup> (Т-лимфоциты супрессоры/ цитотоксические клетки); CD3<sup>+</sup>16<sup>+</sup>56<sup>+</sup> (Т-киллеры); CD3<sup>-</sup>16<sup>+</sup>56<sup>+</sup> (натуральные киллеры, NK-клетки); CD3<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> (активные Т-лимфоциты); CD3<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> (активные В-лимфоциты) по рекомендации рабочей группы СПб РО РААКИ [7, 9] на проточном цитофлюориметре FACScan с использованием моноклональных антител серии Leu производства фирмы "Becton Dickinson"(США).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы "Microsoft Excel". Достоверность отличий рассчитывали с учетом *t*-критерия Стьюдента.

#### **Результаты исследования и их обсуждение.**

Результаты анализа фенотипического состава иммунокомпетентных клеток периферической крови у больных ХГС в динамике лечения препаратом ЭРБИСОЛ<sup>®</sup> УЛЬТРАфарм представлены в таблице 1.

Проведенные исследования показали, что у больных ХГС до начала лечения содержание лимфоцитов с фенотипом CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup> практически не отличалось от значений здоровых доноров. Количество CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов находилось в пределах физиологической нормы (25-35%), но незначительно превышало контрольный показатель, что указывает на активацию цитотоксических клеток в результате антигенной вирусной нагрузки, поскольку именно эта популяция Т-лимфоцитов распознает комплекс вирусного антигена с молекулами МНС класса I (главного комплекса гистосовместимости) на поверхности антигенпрезентирующей клетки. Статистически достоверно повышенным относительно показателей группы доноров оказался уровень Т- и В-лимфоцитов с активационными маркерами (HLA-DR). Относительное количество киллерных клеток с поверхностными антигенами CD3<sup>-</sup>16<sup>+</sup>56<sup>+</sup> было выше нормы, но достоверных различий не выявлено.

Проведение терапии с включением препарата ЭРБИСОЛ<sup>®</sup> УЛЬТРАфарм у больных ХГС приводило к постепенному увеличению относительного количества Т-хелперов (CD4<sup>+</sup>) и Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>) и к концу срока наблюдения превысило исходные показатели соответственно на 7,5 % и 7,8 %. Наряду с этим происходило снижение в сторону нормализации количества цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8<sup>+</sup>). В результате терапии с включением препарата ЭРБИСОЛ<sup>®</sup> УЛЬТРАфарм наблюдалось постепенное и стабильное увеличение иммунорегуляторного индекса (CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>).

У больных ХГС уже после 1-го курса лечения препаратом ЭРБИСОЛ® УЛЬТРАфарм отмечалось повышение относительного количества субпопуляции клеток с фенотипом CD3<sup>+</sup>16<sup>+</sup>56<sup>+</sup> (Т-киллеры), основной функцией которых является осуществление противомикробной защиты путем лизиса инфицированных вирусом клеток. Достоверное увеличение количества этих клеток по сравнению с показателями группы контроля и данными до лечения выявлено после 4-го курса проведенной терапии.

Количество клеток популяции естественных киллеров (CD3<sup>+</sup>16<sup>+</sup>56<sup>+</sup>) у больных ХГС после 1-го и 2-го курсов лечения достоверно снизилось до показателей группы доноров, после 3-го и 4-го курсов наблюдалось незначительное увеличение количества N-киллеров (CD3<sup>+</sup>16<sup>+</sup>56<sup>+</sup>), что можно объяснить механизмом действия препарата ЭРБИСОЛ® УЛЬТРАфарм, который способствует активации натуральных киллеров.

Анализ экспрессии активационных маркеров на поверхности лимфоцитов периферической крови больных ХГС в динамике лечения показал постепенное снижение количества активных Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>) в динамике лечения, что свидетельствует об уменьшении иммуновоспалительного компонента. Снижение количества активных В-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>) было незначительным. Следует отметить, что активированные В-лимфоциты могут вступать в эффекторную ветвь иммунного ответа как клетки с естественной киллерной активностью, которые продуцируют не только различные типы цитотоксических антител, но и широкий спектр медиаторов, наделенных цитотоксическими свойствами, что позволяет им осуществлять иммунологический надзор, то есть оказывать цитотоксическое действие на клетки-мишени (инфицированные вирусом или опухолевые клетки) [4].

В предыдущей публикации [1] нами было отмечено, что у больных ХГС, которые получали только базисное лечение (гепатопротекторы и дезинтоксикационные средства) в течение двух курсов, существенных изменений фенотипического профиля иммунокомпетентных клеток периферической крови (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>) не выявлено. По-прежнему высоким относительно показателя группы доноров оставался уровень CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов, а исходно повышенный уровень NK-клеток (CD3<sup>+</sup>-16<sup>+</sup>56<sup>+</sup>) продолжал увеличиваться как после 1-го, так и после 2-го курса лечения, что является характерным для хронического течения инфекционного процесса; количество клеток с антигенами HLA-DR<sup>+</sup> на протяжении всего периода наблюдения практически не менялось и оставалось на высоком уровне, а количество активных В-лимфоцитов после 1-го курса даже повысилось.

Проведенные исследования позволяют заключить, что препарат ЭРБИСОЛ® УЛЬТРАфарм обладает выраженным иммуномодулирующим действием и воздействует на спе-

цифические (Т-хелперы, Т-супрессоры, Т-киллеры) и неспецифические (N-киллеры) звенья иммунной системы. При этом его действие в большей степени направлено на нормализацию параметров иммунного статуса и проявляется при отклонениях от нормы. Следует отметить, что применение препарата ЭРБИСОЛ® УЛЬТРАфарм при длительной терапии больных ХГС не вызывало угнетения клеточного иммунитета, что часто наблюдается при интерферонотерапии.

Таким образом, анализ субпопуляционного состава иммунокомпетентных клеток у больных ХГС позволил установить положительное влияние препарата ЭРБИСОЛ® УЛЬТРАфарм в динамике длительного лечения.

#### **Выводы.**

1. В процессе лечения больных ХГС препаратом ЭРБИСОЛ® УЛЬТРАфарм было отмечено увеличение количества Т-киллеров (CD3<sup>+</sup>16<sup>+</sup>56) и Т-хелперов (CD4<sup>+</sup>), что может свидетельствовать об их активации.

2. После 1-го и 2-го курсов лечения больных ХГС препаратом ЭРБИСОЛ® УЛЬТРАфарм наблюдалась нормализация исходно высокого уровня N-киллеров (CD3<sup>-</sup>16<sup>+</sup>56<sup>+</sup>) и постепенное снижение количества цитотоксических клеток (CD8<sup>+</sup>) на протяжении всего срока наблюдения, что указывает на уменьшение антигенной вирусной нагрузки.

3. Уменьшение экспрессии антигенов HLA-DR<sup>+</sup> (маркеров поздней активации Т-лимфоцитов) у больных ХГС в динамике лечения препаратом ЭРБИСОЛ® УЛЬТРАфарм свидетельствует об уменьшении иммуновоспалительного компонента.

**Таблиця** - Характеристика субпопуляцій лимфоцитів у больных ХГС в динаміці лікування препаратом ЕРБІСОЛ® УЛЬТРАфарм (M±m).

Показатель	Практически здоровые доноры (n=20)	Больные ХГС (n=31)				
		до лечения	после 1-го курса лечения	после 2-го курса лечения	после 3-го курса лечения	после 4-го курса лечения
CD3+, %	67,5±2,3	66,5±1,65	69,2±1,51	70,8±1,34	71,4±1,28	71,7±1,33
CD4+, %	39,7±2,0	38,7±1,39	40,6±1,28	42,5±1,65	41,9±2,01	42,0±1,83
CD8+, %	27,4±2,1	30,3±0,90	29,1±1,35	27,8±1,20	26,7±1,47	25,8±2,13
CD19+, %	8,6±1,4	9,7±0,64	8,1±0,58	9,5±0,88	8,2±0,43	8,6±0,52
CD3+16+56+, %	4,8±1,1	5,1±0,95	6,5±1,02	6,5±1,32	7,6±1,53	8,2±1,10 * **
CD3 <sup>-</sup> 16+56+, %	9,0±1,5	11,6±1,06	8,8±0,70 **	9,2±0,29 **	9,8±1,12	10,1±2,03
CD3+/HLA-DR+, %	5,7±0,96	11,0±1,22 *	8,7±1,43 *	8,0±0,93 *	7,1±1,25 **	5,8±1,62 **
CD3 <sup>-</sup> /HLA-DR+, %	8,8±1,30	14,0±0,68 *	14,1±0,98 *	13,7±0,95 *	13,8±1,05 *	13,3±1,12 *
CD4+/CD8+	1,37±0,25	1,40±0,09	1,57±0,11	1,70±0,14	1,73±0,22	1,77±0,18

Примечание: \* - P < 0,05 по сравнению с группой доноров, \*\* - P < 0,05 по сравнению с данными до лечения.

### Литература.

1. Базика А.Д, Вовк А.Д., Ніколаєнко О.М. Характеристика фенотипу імуннокомпетентних клітин у хворих на хронічний гепатит С в динаміці лікування препаратом ЕРБІСОЛ® УЛЬТРАфарм // Лікі. - 2004. - № 5-6. - С. 118-122.
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. Ломакин М.С. В-лимфоциты: киллерные функции // Иммунология. – 1990. - № 6. – С. 4-7.
5. Мицура В.М. Жаворонок С.В., Красавцев Е.Л., Карпенко Е.И. Результаты интерферонотерапии хронического гепатита С // Трансфер технологий в свободных экономических зонах. Тенденция. Теория и практика («Транстех-2002»): Сб. докл. I Междунар. научн.-практич. конф. - Гомель: ИММС НАНБ, 2002.- С. 255-257.
6. Николаенко А.Н. Концептуальные подходы в разработке высокоэффективных лекарственных препаратов нового поколения класса “ЭРБИСОЛ УЛЬТРАфарм” // Фармакологічний вісник. – 1998. – № 6. – С. 69– 74.
7. Стандартизация методов иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга человека (рекомендации рабочей группы СПб РО РААКИ) // Мед. иммунология. - 1999.-Т.1, № 5. - С. 21-43.
8. Фесенкова В.Й., Драннік Г.М., Дряньська В.Є., Папакіна В.С., Ващенко С.М. Дослідження *in vitro* впливу препаратів "Ербісол" на продукцію ІЛ-4 та  $\gamma$ -INF Т-хелперами I типу здорових донорів // Лабораторна діагностика. - 2003, № 2. - С. 37-40.
9. Benderitter M., L. Vincent-Genod, A.Berroud et al. Simultaneous analysis of radio-induced membrane alteration and cell viability by flow cytometry // Cytometry. - 2000. - V. 39. - P. 151-157.

**НОВЫЙ ПРЕПАРАТ В ЛЕЧЕНИИ ХРОНИЧЕСКОГО ГЕПАТИТА С****Е.М.Корнилина, А.Н.Николаенко, А.Д.Вовк, И.В.Соляник, А.Д.Базыка**

В статье представлены результаты исследования поверхностного клеточного фенотипа мононуклеаров периферической крови у 31 больного хроническим гепатитом С (ХГС) в динамике лечения с использованием препарата ЭРБИСОЛ® УЛЬТРАфарм. Отмечалось положительное влияние препарата ЭРБИСОЛ® УЛЬТРАфарм на экспрессию поверхностных антигенов мононуклеарных клеток периферической крови больных ХГС. Наблюдалась активация Т-хелперов (CD4+) и Т-киллеров (CD3+16+56+), нормализация высокого уровня НК-клеток (CD3-16+56+), снижение количества активных Т-лимфоцитов (CD3+/HLA-DR+).

**Ключевые слова:** хронический гепатит С, фенотип мононуклеаров крови, ЭРБИСОЛ® УЛЬТРАфарм.

**НОВИЙ ПРЕПАРАТ В ЛІКУВАННІ ХРОНІЧНОГО ГЕПАТИТУ С****О.М.Корніліна, О.М.Ніколаєнко, А.Д.Вовк, І.В.Солянік, А.Д.Базика**

У статті представлені результати дослідження поверхневого клітинного фенотипу мононуклеарів периферичної крові у 31 хворого на хронічний гепатит С (ХГС) в динаміці лікування з використанням препарату ЕРБИСОЛ® УЛЬТРАфарм. Було відмічено позитивний вплив препарату ЕРБИСОЛ® УЛЬТРАфарм на експресію поверхневих антигенів мононуклеарних клітин периферичної крові у хворих на ХГС. Спостерігалась активація Т-хелперів (CD4+) та Т-кілерів (CD3+16+56+), нормалізація високого рівня НК-клітин (CD3-16+56+), зниження кількості активних Т-лімфоцитів (CD3+/HLA-DR+).

**Ключові слова:** хронічний гепатит С, фенотип мононуклеарів крові, ЕРБИСОЛ® УЛЬТРАфарм.

**NEW PREPARAT IN TREATMENT OF CHRONIC HEPATITIS C****E.M. Kornilina, A.N. Nikolayenko, A.D. Vovk, I.V. Solyanik, A.D. Bazuka.**

In the article are represented investigation results of blood mononuclear cells phenotyp in 31 patients with chronic hepatitis C infection (CHC) by treatment ERBISOL® ULTRAPharm. It was determined positive influence on antigens expression of blood mononuclear cells in CHC patients. Was observed the activation of T-helpers (CD4+) and T-killers (CD3+16+56+), a normalization of high level NK-cells (CD3-16+56+), a decrease of activated T-lymphocytes quantity (CD3+/HLA-DR+).

**Key words:** chronic hepatitis C infection, phenotyp of blood mononuclears, ERBISOL® ULTRAPharm.