

УДК: 616.36-002-036:616.155.394.5-037

СПОСОБ ПРОГНОЗА РАЗВИТИЯ НЕЙТРОПЕНИИ IN VIVO ПО REBUCK У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ С

Донцов Д.В., Амбалов Ю.М.

ГОУ ВПО Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону, Россия, e-mail:d_dontcov@mail.ru

Применение комбинированной противовирусной терапии позволяет добиться стойкого вирусологического ответа у больных хроническим гепатитом С, однако, у некоторых пациентов на фоне лечения развивается выраженная нейтропения. Резкое снижение числа нейтрофилов крови зачастую требует прекращения проводимой терапии. В работе предложен новый способ прогноза нейтропении in vivo у больных хроническим гепатитом С, получающих комбинированную противовирусную терапию.

Ключевые слова: хронический гепатит С, противовирусная терапия, нейтропения, прогноз.

METHOD FOR FORECASTING DEVELOPMENT OF GRANULOCYTOPENIA IN VIVO OF REBUCK IN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C

Dontsov D.V., Ambalov Yu.M.

Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russia, e-mail:d_dontcov@mail.ru

The patients with chronic hepatitis C, who received combination antiviral therapy, were able to achieve firmness virusological results. Some patients, however, during the treatment developed granulocytopenia. When neutrophil in blood drops sharply, often required to stop the current treatment. In presence, through in-vitro we offer new method for forecasting granulocytopenia in patients with chronic hepatitis C in combination antiviral therapy.

Key words: chronic hepatitis C, antiviral therapy, granulocytopenia, forecast.

Хронический гепатит С (ХГС) представляет собой одну из наиболее важных проблем здравоохранения во всем мире, что связано с широким распространением этого заболевания и высоким риском развития неблагоприятных исходов – цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы [2, 3, 7].

В настоящее время применение комбинированной противовирусной терапии (КПТ) препаратами интерферона альфа (ИФН α) и рибавирина позволяет добиться стойкого вирусологического ответа и обеспечить предупреждение неблагоприятных исходов у больных ХГС [2, 9]. Однако, у некоторых пациентов, проходящих курс комбинированной противовирусной терапии, регистрируется снижение количества и угнетение фагоцитарной активности нейтрофилов, что может приводить к развитию бактериальных осложнений со стороны различных органов и систем [4, 5].

Выраженная интерферон-рибавирииндуцированная нейтропения требует снижения дозы применяемых препаратов или же их полной отмены [1], между тем, наиболее важным условием достижения устойчивого вирусологического ответа является, как известно, сохранение терапевтической дозы КПТ на максимально высоком уровне [3]. Схемы, применяемые для лечения уже развившегося нейтропенического синдрома у

больных ХГС, требуют существенных материальных затрат, что, в современных условиях, не рационально с позиций фармакоэкономики, поэтому разработка доступных методов, направленных на как можно раннее выявление и предупреждение развития нейтропении у данной категории лиц, представляется весьма актуальной.

К сожалению, механизм развития нейтропении, обусловленной КПТ, до настоящего момента окончательно не установлен. Как известно, существует два типа гибели клеток – некроз и апоптоз. Первый ассоциируется с нарушением целостности клеточной мембраны вследствие повреждения или формирования пор. Апоптоз характеризует более мягкий процесс и предполагает серию морфологических изменений, приводящих к клеточной гибели. В настоящее время общепризнано, что этот процесс занимает ключевые позиции в элиминации аутореактивных Т-лимфоцитов, уничтожении опухолевых и вирусинфицированных клеток, в том числе и при HCV-инфекции [8].

Цель исследования: изучить у больных хроническим гепатитом С, получающих комбинированную противовирусную терапию, патогенетическую роль апоптоза нейтрофилов в развитии интерферон-рибавирининдуцированной нейтропении и на основе полученных данных разработать новый способ ее прогноза.

Материал и методы исследования

Для изучения структурных изменений в нейтрофильных гранулоцитах, происходящих у больных ХГС под действием противовирусных препаратов, определялся апоптоз нейтрофилов *in vivo* методом кожного «окна». Метод оценки функционального состояния нейтрофилов в кожном «окне» был впервые предложен Rebusk J.W. et al. [10]. Метод заключается в том, что на скарифицированный участок кожи фиксируют предметное стекло на 24 часа, после снятия стекла его подвергают окраске по Романовскому – Гимзе, под световым микроскопом подсчитывают клетки и описывают их морфологические особенности, которые отражают состояние миелоидного ростка кроветворения и способность организма реагировать на изменяющиеся условия гомеостаза. При постановке теста учитываются такие изменения цитоплазмы нейтрофилов, как нарушение ее зернистости; образование, повреждение или распад псевдоподий, а также мелкая фрагментация и расплывчатость ядер.

Постановка теста кожного «окна» у больных ХГС осуществлялась нами следующим образом. У пациентов с участка кожи на ладонной поверхности правого и левого предплечий, предварительно обработанных 96 % этиловым спиртом, скарификатором снимали слой эпидермиса 0,5×0,5 см. до сосочкового слоя дермы без повреждения

сосудов. В место скарификации правого предплечья вносили 0,3 мл. 0,9 % раствора хлорида натрия. Затем этот участок покрывался стерильным предметным стеклом, которое фиксировалось лейкопластырем. На другое предметное стекло наносили с помощью микропипетки 3-5 капель, т. н., индуктора апоптоза нейтрофилов (ИАН) и после его высыхания фиксировали на скарифицированном участке левого предплечья. В качестве ИАН использовались препараты, применяемые у больных ХГС в качестве КПТ: 80 мг (1/5 разовой дозы) Ребетолы и 0,6млн. МЕ (1/5 суточной дозы) Альтевира, разведенные в 1,0 л 0,9 % раствора натрия хлорида. Такое соотношение компонентов ИАН подобрано с учетом фармакокинетики (абсолютная биодоступность, максимальная концентрация препарата в плазме, объем распределения) и терапевтических доз рибавирина и ИФНа [6]. Через 24 часа стекла снимали, высушивали, фиксировали и окрашивали. Полученные мазки-отпечатки микроскопировали в иммерсионной системе 1×450, подсчитывали % содержания нейтрофилов от общего числа клеток (200 клеток) и проводили сравнительную морфологическую оценку с подсчетом процента нейтрофилов, находящихся в апоптозе, в каждом "кожном окне".

Стандартность условий данного исследования обеспечивалась использованием точно дозированных порций крови, антикоагулянта, ИАН, постоянством термостатной температуры, неизменностью фактора времени.

Определение апоптоза нейтрофилов в кожном «окне» было выполнено у 125 больных ХГС (90 женщины, 35 мужчин), находившихся на лечении в Гепатологическом центре МЛПУЗ «Городская больница №1 им. Н.А.Семашко» г. Ростова-на-Дону в период 2008-2011 гг. Критериями включения пациентов в исследование явились: 1) наличие в крови суммарных antiHCV, выявленных, как минимум, двукратно в условиях нескольких независимых лабораторий; 2) положительный результат детекции РНК HCV в крови; 3) срок наблюдения не менее 1 года; 4) отсутствие ранее проводимой терапии препаратами рибавирина и ИФНа; 5) отсутствие тяжелых сопутствующих соматических заболеваний, в том числе и других вариантов гепатитов; 6) отсутствие аутоиммунной патологии; 7) отсутствие декомпенсации заболевания с развитием цирроза печени. Исследуемые лица были равнозначны по своим исходным клинико-лабораторным данным и не имели противопоказаний к проведению антивирусной терапии. Генотипирование HCV осуществляли методом праймерспецифической ПЦР с использованием тест-систем «Амплисенс HCV генотип» фирмы «Интерлабсервис» (Россия). Генотип 1β HCV регистрировался в 54,4 % случаев, 3а – в 25,6 %, 2а – в 16,8 %. У 4 больных генотип HCV не был идентифицирован. Количество РНК HCV менее 3×10^5 МЕ/мл было отмечено у 24,0 % наблюдавшихся лиц, от 3×10^5 МЕ/мл до 6×10^5 МЕ/мл – у 60,8 % и более 6×10^5 МЕ/мл – у

15,2 %. Средний возраст обследованных составил $38,2 \pm 7,4$ лет, длительность заболевания – $11,7 \pm 5,6$ лет.

Статистическая обработка данных была проведена пакетом Microsoft Excel, о достоверности отличий учитываемых показателей судили по величине t-критерия Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение

Исследование апоптоза нейтрофилов у больных ХГС проводилось перед началом у них КПТ. Качественный состав мазков-отпечатков кожи у больных ХГС был представлен нейтрофилами, макрофагами и лимфоцитами. Относительное количество указанных клеток, выделяемых на стекло с кожи правого предплечья контрольного «окна», составило соответственно $63,8 \pm 2,6$ %, $33,1 \pm 2,9$ % и $3,1 \pm 0,4$ %. Количественный состав клеток в мазках-отпечатках с кожи левого предплечья, т.е. опытного «окна» был практически идентичным ($p > 0,05$).

Процент нейтрофилов, подвергнутых спонтанному апоптозу на правом предплечье, у 125 больных ХГС составил в среднем $7,5 \pm 0,07$ %. Следует отметить, что на левом предплечье у 108 пациентов (86,4 %) уровень индуцированного апоптоза не имел достоверных отличий с контролем ($7,7 \pm 0,09$ %, $p > 0,05$). У оставшихся 17 больных ХГС (13,6 %) процент сегментоядерных нейтрофилов, вступивших в апоптоз под действием ИАН, составил $62,5 \pm 3,11$ %, что значительно превысило средний показатель спонтанного апоптоза у этих пациентов на правом предплечье ($p < 0,001$).

После определения индуцированного апоптоза нейтрофилов в каждом «окне» всем наблюдаемым лицам проводилась КПТ по схеме: «Альтевир» 3 млн. МЕ внутримышечно 3 раза в неделю и «Ребетол» 800-1200 мг в сутки перорально 24-72 недели в зависимости от генотипа HCV, уровня вирусной нагрузки, а также частоты появления быстрого и раннего вирусологического ответа.

В процессе лечения минимум 1 раз в неделю у больных определялся уровень нейтрофилов в крови с помощью гематологического анализатора «МЕК-8222» (Nihon Kohden, Япония). Среднее значение абсолютного числа нейтрофилов (АЧН) у больных ХГС перед курсом КПТ составило $3,6 \pm 0,09 \times 10^9/L$. Динамическое наблюдение за пациентами в течение всего периода КПТ показало, что статистически значимое снижение АЧН отмечалось на 8-10 неделях лечения, достигнув в среднем $1,9 \pm 0,05 \times 10^9/L$, $p < 0,001$.

Проведя корреляционный анализ, мы констатировали наличие обратной связи между средним значениями индуцированного апоптоза нейтрофилов в каждом «окне» у и

уровнем АЧН на 8-10 неделях КППТ ($r=-0,65$; $p<0,001$). Так, у тех пациентов, у которых показатель индуцированного апоптоза нейтрофилов в каждом «окне» составил $8,2\pm 0,09$ %, минимальное количество нейтрофилов оставалось в пределах $2,2\pm 0,04\times 10^9/L$, что не требовало дополнительной коррекции лечения. Значительно более выраженная нейтропения отмечалась у тех больных ХГС, которые имели в начале исследования среднее значение индуцированного апоптоза нейтрофилов $62,5\pm 3,11$ %, так минимальный уровень нейтрофилов в этой группе пациентов составил в среднем $0,64\pm 0,04\times 10^9/L$, что оказалось достоверно ниже ($p<0,01$), чем у остальных, причем у 3-х из них АЧН к 8-10 неделе лечения снизилось до $0,45\times 10^9/L$, что привело к отмене проводимой КППТ.

Наличие обратной корреляционной связи позволило разработать нам способ ориентировочного прогноза развития интерферон-рибавирининдуцированной нейтропении у больных ХГС *in vivo* (Способ прогноза интерферон-рибавирининдуцированной нейтропении у больных хроническим гепатитом С, получающих комбинированную противовирусную терапию. Заявка на изобретение № 2011102092, приоритет от 20.01.2011.) Было установлено, что при выявлении у пациентов показателя индуцированного апоптоза нейтрофилов в каждом «окне» ≥ 40 %, с вероятностью более 84 % можно судить о высоком риске развития у них нейтропении, при проведении им в дальнейшем КППТ. Данный способ технически прост и экономичен, обеспечивает быстрое получение результата и не требует для своего проведения специально оборудованной лаборатории.

Обсуждение

Как известно, успех современного лечения ХГС в значительной степени лимитируется рядом факторов, к которым относятся генотип HCV, уровень вирусной нагрузки, возраст больного в период лечения, различные внепеченочные поражения, темп прогрессирования фиброза печени, наличие вирусного стеатоза и др. Неблагоприятное фоновое состояние больных ХГС уменьшает результативность лечения, способствуя формированию нежелательных эффектов проводимой терапии, в том числе и развитию интерферон-рибавирининдуцированной нейтропении. Результаты, полученные нами при исследовании 125 больных хронической HCV-инфекцией, позволяют сделать следующие выводы:

1. Индукция апоптоза нейтрофилов препаратами рибавирин и ИФН α имеет важное патогенетическое значение в развитии нейтропении у сенсibilизированных к ним больных ХГС.

2. Высокие значения индуцированного апоптоза нейтрофилов в «окне» ≥ 40 % являются прогностически неблагоприятным признаком развития нейтропении у данной категории пациентов при последующем назначении им препаратов интерферона- α и рибавирина.

Список литературы

1. Авдеева М. Г., Городин В. Н., Редько Е. Н. и др. Вирусные гепатиты: стратегия и тактика терапии, организация медицинской помощи: пособие для врачей. — Краснодар, 2009. — С. 112-113.

2. Амбалов Ю. М., Усаткин А. В., Кузнецов В. П. и др. Эффективность гемолизата аутокрови у больных рожей нижних конечностей // Успехи современного естествознания. — 2003. — № 11. — С. 39.

3. Баранова И. П., Афтаева Л. Н., Краснова Л. И. и др. Противовирусная эффективность различных форм интерферона в терапии хронического гепатита С // Инфекционные болезни. — 2010. — Т. 8, № 2. — С. 13-16.

4. Блохина Н. П., Никитин И. Г. Особенности фармакологической динамики и кинетики пегилированного альфа-интерферона «Пегасис»: новые возможности терапии хронического гепатита С // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. — 2002. — Т. 12, № 6. — С. 17-24.

5. Воробьев П. А., Авксентьева М. В., Юрьев А. С. и др. Клинико-экономический анализ. Оценка, выбор медицинских технологий и управления качеством медицинской помощи. — М., 2004. — 404 с.

6. Исаков В. А. Современная терапия хронического вирусного гепатита С: Какая длительность комбинированной терапии оптимальна и почему? // Клиническая гастроэнтерология и гепатология. — 2009. — Т. 2, № 1. — С. 9-12.

7. Мамаев С. Н., Рамазанов Ш. Р., Буеверов А. О. и др. Динамика уровней цитокинов сыворотки крови при противовирусной терапии // Клинические перспективы гастроэнтерологии, гепатологии. — 2008. — № 2. — С. 28-31.

8. Мангушева Я. Р., Фазылов В. Х. Влияние альфа-интерферонотерапии на фагоцитарные механизмы защиты при хроническом гепатите С // Инфекционные болезни. — 2009. — Т. 7, № 1. — С. 26-32.

9. Маянский Н. А. Внутренний путь апоптоза нейтрофилов и механизмы антиапоптозного эффекта гранулоцитарного колониестимулирующего фактора // Иммунология. — 2004. — Т. 25, № 6. — С. 329-335.

10. Мельник Г. В., Пляс В. И., Городин В. Н. и др. // Инфекционные болезни. — 2007. — Т. 5, № 2. — С. 75-78.

11. Справочник ВИДАЛЬ Лекарственные препараты в России: Справочник. — М., 2010. — 1728 с.

12. Юшкевич Л. Б., Шевырева Н. А. Современные методы клинико-лабораторных исследований в диагностике профессиональных заболеваний. — М., 1973. — С. 53-56.

13. Canbay A. Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis // Hepatology. — 2004. — Vol. 39. — P. 273-278.

14. Cheong H. R., Woo H. Y., Heo J. et al. Clinical efficacy and safety of the combination therapy of peginterferon alpha and ribavirin in cirrhotic patients with HCV infection // Korean J. Hepatol. — 2010. — Vol. 16, N 1. — P. 38-48.

15. Rebeck J. W., Crowley J. N., Ann. N. Y. // Acad. Sci. — 1955. — Vol. 59. — P. 757-805.

Рецензенты:

Яговкин Э.А., д.м.н., ст. научный сотрудник, заместитель директора Ростовского научно-исследовательского института микробиологии и паразитологии Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону.

Ермолова Н.В., д.м.н., ст. научный сотрудник ФГУ «Ростовского научно-исследовательского института акушерства и педиатрии» Минздравсоцразвития, г. Ростов-на-Дону.

Работа получена 26.10.2011.