

## **ИЗМЕНЕНИЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРИ РАЗВИТИИ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ОСЛОЖНЕНИЙ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ С, ПОЛУЧАЮЩИХ КОМБИНИРОВАННУЮ ПРОТИВОВИРУСНУЮ ТЕРАПИЮ**

**Донцов Д.В., Амбалов Ю.М., Мамедова Н.И.**

*Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону, Россия (344022, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29), e-mail: d\_dontcov@mail.ru*

Применение у больных хроническим гепатитом С комбинированной противовирусной терапии препаратами интерферона и рибавирина позволяет добиться в большинстве случаев устойчивого вирусологического ответа. Однако у некоторых пациентов на фоне лечения развиваются различные побочные эффекты. Особое место среди нежелательных проявлений специфической терапии хронического гепатита С занимают гематологические осложнения. Резкое снижение в периферической крови числа эритроцитов, нейтрофилов и тромбоцитов зачастую требует снижения дозы противовирусных препаратов или же полного прекращения проводимой терапии. В данном исследовании мы изучили характер изменений ряда показателей иммунного статуса и цитокинового профиля у больных хроническим гепатитом С с развившимися на фоне приема комбинированной противовирусной терапии цитопеническими синдромами. Была обнаружена взаимосвязь между выявленными иммунологическими сдвигами и степенью выраженности гематологических осложнений проводимой этиотропной терапии хронического гепатита С. Полученные данные планируется использовать в дальнейшем для разработки способа прогноза развития гематологических осложнений у больных хроническим гепатитом С, получающих комбинированную противовирусную терапию.

Ключевые слова: хронический гепатит С, противовирусная терапия, гематологические осложнения.

## **CHANGES IN IMMUNOLOGICAL INDICES IN HAEMATOLOGICAL COMPLICATIONS IN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C TREATED WITH COMBINATION ANTIVIRAL THERAPY**

**Dontsov D.V., Ambalov Y.M., Mamedova N.I.**

*Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russia (344022, Rostov-on-Don, Nakhichevan street, 29), e-mail: d\_dontcov@mail.ru*

Use in patients with chronic hepatitis C combination antiviral therapy with interferon and ribavirin achieves in most cases, sustained virologic response, which indicates a positive treatment outcome. However, at some patients during treatment can be development of various side effects. A special place among the adverse events of specific therapy for chronic hepatitis C take haematological disorders. The sharp decline in the number of peripheral blood erythrocytes, neutrophils and platelets often requires a dose reduction of antiviral drugs or complete cessation of the therapy. In this scientific research, we examined the nature of changes a number of indicators of immune status and cytokine profile at the patients with chronic hepatitis C who had development cytopenia during the receive combination antiviral therapy. Was found significantly associated with the identified patients immunological changes and the degree of their hematological complications pursued causal treatment of chronic hepatitis C. These results we plan to use at the future for creation of method forecasting of development hematological complications at patients with chronic hepatitis C, who receives combined anti-virus therapy.

Keywords: chronic hepatitis C, antiviral therapy, hematological complications.

«Золотым стандартом» в лечении хронического гепатита С (ХГС) признана во всем мире комбинированная противовирусная терапия (КПТ) с использованием препаратов пегилированного интерферона-α (пег-ИФН-α) и рибавирина [9]. В Российской Федерации используются также схемы лечения ХГС с применением препаратов стандартного рекомбинантного ИФН-α преимущественно у лиц, инфицированных 2-м и 3-м генотипами

HCV. Современная тактика применения КППТ у больных ХГС построена по принципу Response Guided Therapy – «терапии согласно вирусологическому ответу». В настоящее время доказано, что достижение устойчивого вирусологического ответа (УВО) на 99% ассоциировано с возможностью полной элиминации вируса и является конечной точкой терапии ХГС [7]. К сожалению, серьезной проблемой КППТ продолжает оставаться развитие нежелательных явлений, среди которых особое место занимают гематологические осложнения [3]. Появление выраженных гематологических нарушений ставит под угрозу состояние больного и требует немедленной модификации или же полной отмены проводимой терапии, что в обоих случаях является лимитирующим фактором достижения УВО [8; 10].

В настоящее время на кафедре инфекционных болезней Ростовского государственного медицинского университета проводится ряд исследований, направленных на детальную расшифровку различных сторон патогенеза гематологических осложнений КППТ у больных ХГС [1; 2; 4; 5]. Учитывая тот факт, что многие современные авторы уделяют пристальное внимание состоянию показателей иммунной системы у пациентов, страдающих хронической HCV-инфекцией [6], мы в аспекте нашего приоритетного научно-исследовательского направления также не могли пройти мимо данной проблемы.

**Цель исследования** – изучить характер изменений показателей иммунного статуса и цитокинового профиля у больных ХГС и определить, имеется ли какая-либо патогенетическая связь между частотой их отклонений от нормы и степенью выраженности гематологических осложнений КППТ.

#### **Материал и методы исследования**

В общей сложности в работу было включено 228 больных ХГС, имевших показания к КППТ. Генотип HCV 1a встречался у 3,5%, 1b – 51,3%, 3a – 28,9% и 2a – 16,2% человек. Уровень вирусной нагрузки (ВН) у 30,3% пациентов составил  $<3 \times 10^5$  МЕ/мл, у 46,1% –  $3 \times 10^5$ - $6 \times 10^5$  МЕ/мл и у 23,7%  $>6 \times 10^5$  МЕ/мл. Всем испытуемым согласно международным стандартам была назначена КППТ: 51,3% пациентов получали рибавирин в сочетании с пег-ИНФ- $\alpha$ , а 48,7% – в сочетании с «короткими» ИНФ- $\alpha$ .

Определение показателей гемограммы проводилось методом автоматического гематологического анализа («Advia 2120i» (Siemens)) непосредственно перед началом КППТ, через 4, 8, 12, 24 и 48 (лица, инфицированные 1-м генотипом HCV) недель КППТ. Особое внимание мы уделяли таким показателям, как концентрация гемоглобина (Hb) г/дл, абсолютное число нейтрофилов (АЧН) $\times 10^9$ /л и количество тромбоцитов (Тр) $\times 10^9$ /л в крови.

Набор выполненных иммунологических тестов включал в себя: 1) определение стандартного для иммунограммы 2-го уровня субпопуляционного состава лимфоцитов в

тесте с моноклональными антителами; 2) фенотипирование маркеров ранней и поздней активации лимфоцитов: CD3/CD25+, CD3/HLA DR+, CD3/CD95+; 3) определение содержания сывороточных иммуноглобулинов (Ig) классов А, М, G и циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК); 4) определение количественного уровня цитокинов сыворотки крови: ИЛ1 $\beta$ ; ИЛ2; ИЛ4; ИЛ6; ИЛ8; ИФН- $\alpha$ , - $\beta$  и - $\gamma$ ; ФНО- $\alpha$ ; ТФР- $\beta$ ; 5) определение уровня экспрессии рецепторов лимфоцитов к ИФН- $\alpha$  и ИФН- $\gamma$  (CD118+ и CD119+ соответственно), а также – к ИЛ1 $\beta$ , CD121a+, CD121b+ и ФНО- $\alpha$ . Показатели клеточного иммунитета исследовали на проточном цитофлюориметре EPICS XL (Coulter Corporation, США) с использованием моноклональных антител CD3+, CD4+, CD8+, CD16+, CD118+, CD119+, CD20+, CD56+, CD16CD56+, CD3/CD25+, CD3/CD95+, CD3/HLA DR (АО «Сорбент», НИИ иммунологии МЗСР РФ) по методу А.В. Филатова и соавт. (1990). Для определения популяций лимфоцитов, экспрессирующих поверхностные антигенные маркеры CD118+ и CD119+, использовали набор моноклональных антител фирмы Caltag (США). Исследование концентрации сывороточных иммуноглобулинов классов А, М и G проводили с помощью специфических сывороток против человеческого иммуноглобулина (НИИВС им. И.И. Мечникова) методом радиальной иммунодиффузии в геле (Manchini et al., 1965). Уровень ЦИК определяли по методу Haskova et al. (1978) в модификации Ю.А. Гриневич и А.И. Алферова (1981). Для выявления методом ИФА уровня ТФР- $\beta$  в крови использовали тест-систему фирмы «Bio Source» (Europe S.A.). Исследование содержания в крови остальных цитокинов также осуществляли методом ИФА с использованием тест-систем «Pro Con...» (ООО «Протеиновый контур», РФ). Постановку всех указанных лабораторных тестов проводили в соответствии с инструкциями фирм-изготовителей. Заключительным этапом явился тщательный статистический анализ полученных результатов, который был выполнен после полного завершения клинико-лабораторно-инструментального мониторинга всех пациентов.

### **Результаты исследования**

В результате проведенного лечения в общей сложности УВО был достигнут у 155 (68,0%) пациентов, из них 64 (41,3%) были инфицированы 1-м; 34 (21,9%) – 2-м и 57 (36,8%) – 3-м генотипами HCV. Среди получавших пег-ИФН- $\alpha$  (n=117) частота УВО составила 54,7% (n=64); получавших «короткие» ИФН- $\alpha$  (n=111) – 82,0% (n=91). У больных, инфицированных 1-м генотипом HCV (n=125), УВО отмечался в 51,2% (n=64) случаев; у инфицированных 2-м (n=37) и 3-м (n=66) генотипами HCV – в 91,9% (n=34) и 86,4% (n=57) случаев соответственно. Проведение КПТ прекращалось при отсутствии через 12 недель лечения раннего вирусологического ответа (РВО) и/или развитии у пациентов тяжелых нежелательных явлений противовирусной терапии. В итоге из 228 больных ХГС полностью закончили курс КПТ 163 человека (71,5%). У 8 пациентов (3,5%) терапия была отменена уже

через 8 недель лечения исключительно по причине развития тяжелых гематологических осложнений КПТ. У 57 больных ХГС (25,0%) было зафиксировано отсутствие РВО, причем у 9 из них (3,9%) параллельно наблюдалось развитие к 12-й неделе КПТ тяжелых осложнений со стороны системы крови, также требовавших отмены терапии.

При оценке степени тяжести КПТ-ассоциированной анемии у больных ХГС была использована классификация Европейского общества медицинской онкологии, согласно которой выделяют легкую (Hb 10,0-11,9 г/дл), умеренную (Hb 8,0-9,9 г/дл) и тяжелую (Hb <8,0 г/дл) степени анемии [3]. В нашем случае развитие анемии в ходе КПТ было зафиксировано в общей сложности у 89 (39,0%) больных ХГС, при этом у 32 (14,0%) пациентов анемия была легкой; у 44 (19,3%) – умеренной и у 13 (5,7%) – тяжелой степени. Учитывая полученные данные, сразу после завершения/вынужденного прекращения КПТ мы выполнили определение количественного уровня показателей иммуноцитокинетического профиля крови у 39 больных ХГС без анемии (1-я группа), у 31 – с легкой (2-я группа) и у 33 – с умеренной и тяжелой КПТ-ассоциированной анемией (3-я группа). При этом в ходе работы мы зафиксировали наличие лиц как с понижением, так и с повышением целого ряда исследуемых иммунологических показателей во всех наблюдаемых группах. Повышение количественного уровня касалось, в первую очередь, CD4+ (Т-хелперов), Th2 (Т-хелперов 2-го типа), иммунорегуляторного индекса (CD4+/CD8+), CD20+ (В-клеток), CD120+ (клеток, экспрессирующих рецепторы к ФНО- $\alpha$ ), ЦИК (циркулирующих иммунных комплексов), IgA и G, ТФР- $\beta$  (трансформирующего фактора роста), ИЛ-4 и ИЛ-6. Практически все вышеуказанные сдвиги с разной степенью статистической достоверности были более выраженными у лиц с умеренной и тяжелой степенью КПТ-ассоциированной анемии. Что касается повышения уровней ИФН- $\gamma$ , ИЛ-2, ИЛ-8, то в данном случае мы наблюдали обратную направленность. Частота отклонений от нормы прочих иммунологических показателей не имела сколь-нибудь значимых отличий между сравниваемыми группами (во всех случаях  $p > 0,05$ ) и вполне соответствовала тем характеристикам, которые представлены в современной научной литературе касательно иммунопатогенеза ХГС [6].

Для характеристики КПТ-ассоциированной нейтропении у больных ХГС мы использовали общепринятую классификацию, согласно которой выделяют легкую (АЧН  $1,0-1,3 \times 10^9$ /л), умеренную (АЧН  $0,75-0,99 \times 10^9$ /л), тяжелую (АЧН  $0,5-0,74 \times 10^9$ /л) и крайне тяжелую (АЧН  $<0,5 \times 10^9$ /л) степени нейтропении [3]. В нашей работе развитие нейтропении в ходе КПТ отмечалось в общей сложности у 110 (48,3%) пациентов, при этом у 29 (12,7%) из них нейтропения была легкой; у 40 (17,5%) – умеренной, у 33 (14,5%) – тяжелой и у 8 (3,5%) – крайне тяжелой степени. Руководствуясь вышеизложенным, сразу после завершения/вынужденного прекращения антивирусной терапии нами было также выполнено

определение количественного уровня показателей иммуноцитокинового профиля крови у 37 больных ХГС без нейтропении (1-я группа), у 33 – с легкой и умеренной (2-я группа) и у 31 – с тяжелой и крайне тяжелой КППТ-ассоциированной нейтропенией (3-я группа). В результате было обнаружено, что частота встречаемости некоторых иммунологических сдвигов имела между сравниваемыми группами достоверные отличия. Так, во 2-й группе лиц оказался наиболее высоким удельный вес пациентов, имевших повышение количественного уровня таких показателей, как FcγR (нейтрофилов, экспрессирующих рецепторы к Fc-фрагменту IgG), C3bR (нейтрофилов, экспрессирующих рецепторы к C3-компоненту комплемента), НСТ-тест спонтанный и стимулированный (интенсивность спонтанного и стимулированного кислородзависимого метаболизма фагоцитов), Кст. (функциональные метаболические резервы фагоцитов), ТФР-β (трансформирующий фактор роста), ИФН-γ, и ИЛ-8. Практически все вышеуказанные показатели имели противоположную направленность у больных ХГС с тяжелой и крайне тяжелой КППТ-ассоциированной нейтропенией, за исключением ФНО-α, частота повышения которого была практически идентична у пациентов 2-й и 3-й группы – 42,4±8,6% и 54,8±8,9% случаев соответственно (p>0,05). Лица, у которых средний показатель АЧН на протяжении всего курса КППТ оставался в пределах нормы, имели, как правило, гораздо менее выраженные иммунологические сдвиги. Частота отклонений от нормы прочих показателей иммуноцитокинового профиля не имела достоверных отличий между сравниваемыми группами (во всех случаях p>0,05) и в целом не противоречила тем результатам, которые мы получили при изучении у больных ХГС патогенеза КППТ-ассоциированной анемии.

При изучении степени тяжести КППТ-ассоциированной тромбоцитопении нами была использована классификация, согласно которой выделяют легкую (Тр 150-75×10<sup>9/л</sup>), умеренную (Тр 74-50×10<sup>9/л</sup>) и тяжелую (Тр <50×10<sup>9/л</sup>) степени тромбоцитопении [3]. В результате было установлено, что тромбоцитопения на разных этапах КППТ развилась у 30,3% пациентов, при этом легкая степень отмечалась у 16,2%; умеренная – у 10,5% и тяжелая – у 3,5% больных ХГС. В связи с чем непосредственно после завершения/вынужденного прекращения антивирусной терапии мы выполнили определение количественного уровня показателей иммуноцитокинового профиля крови у 36 больных ХГС без тромбоцитопении (1-я группа), у 31 – с легкой (2-я группа) и у 32 – с умеренной и тяжелой КППТ-ассоциированной тромбоцитопенией (3-я группа). Повышение количественного уровня в данном случае касалось, прежде всего, таких показателей: CD4+ (Т-хелперов), Th2 (Т-хелперов 2-го типа), иммунорегуляторного индекса (CD4+/CD8+), CD20+ (В-клеток), CD120+ (клеток, экспрессирующих R к ФНО-α), ЦИК (циркулирующих иммунных комплексов), IgA и G, ТФР-β (трансформирующего фактора роста), ИЛ-4 и ИЛ-6.

Все вышеуказанные иммунологические сдвиги имели максимальную степень выраженности у больных ХГС 3-й группы. Такие показатели, как ИФН- $\gamma$  и ИЛ-2, демонстрировали при этом противоположную направленность. В целом же результаты проведенного исследования вполне соответствовали тем, которые были получены нами при изучении особенностей развития КПТ-ассоциированной анемии.

### **Выводы**

1. Однонаправленные изменения иммуноцитокинового профиля у больных ХГС при развитии КПТ-ассоциированной анемии и тромбоцитопении, вероятнее всего, свидетельствуют о весьма близких механизмах иммунопатогенеза данных нежелательных явлений проводимой терапии.
2. Характер выявленных иммунологических сдвигов у больных ХГС при развитии КПТ-ассоциированной анемии и тромбоцитопении, как нам представляется, свидетельствует о вовлечении в процесс их формирования аутоиммунных механизмов.
3. Характер выявленных иммунологических сдвигов у больных ХГС при развитии легкой и умеренной КПТ-ассоциированной нейтропении, по всей вероятности, свидетельствует о повышении миграционной активности нейтрофильных гранулоцитов и усилении при этом их способности к фагоцитозу, в то время как при развитии тяжелой и крайне тяжелой КПТ-ассоциированной нейтропении эти две важнейшие функции нейтрофильных гранулоцитов, наоборот, резко угнетаются.

В заключение хочется отметить, что данное исследование проводилось нами не только с научной, но и с практической целью, поскольку полученные результаты мы планируем использовать в дальнейшем при разработке способа прогноза гематологических осложнений КПТ у больных хроническим гепатитом С.

### **Список литературы**

1. Амбалов Ю.М. [и др.] Анемия у больных хроническим гепатитом С, получающих комбинированную противовирусную терапию. Клинические проявления. Особенности патогенеза // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 3. - URL: [www.science-education.ru/117-13272](http://www.science-education.ru/117-13272) (дата обращения: 03.06.2014).
2. Амбалов Ю.М., Донцов Д.В., Мамедова Н.И. Современные представления о проблеме гематологических осложнений комбинированной противовирусной терапии хронического гепатита С // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 5. - URL: [www.science-education.ru/117-13272](http://www.science-education.ru/117-13272) (дата обращения: 22.10.2014).

3. Бакулин И.Г. Гематологические нежелательные явления при проведении противовирусной терапии у больных хроническим гепатитом С / И.Г. Бакулин, Ю.Г. Сандлер, А.С. Шарабанов // Гепатологический форум. – 2011. – № 4. – С. 2-14.
4. Донцов Д.В., Амбалов Ю.М., Мамедова Н.И. Нейтропения у больных хроническим гепатитом С, получающих комбинированную противовирусную терапию. Клинические проявления. Особенности патогенеза // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 5. - URL: [www.science-education.ru/117-13272](http://www.science-education.ru/117-13272) (дата обращения: 13.10.2014).
5. Донцов Д.В., Тромбоцитопения у больных хроническим гепатитом С, получающих комбинированную противовирусную терапию. Клинические проявления. Особенности патогенеза / Д.В. Донцов [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 10. – С. 59-63.
6. Леонова Л.М. Особенности иммуногематологического статуса у больных хроническим вирусным гепатитом С : автореф. дис. ... канд. мед. наук. – СПб., 2009. – 17 с.
7. Руководство EASL 2011. Лечение гепатита С. Перспективы // Best clinical practice. Русское издание. – 2011. – № 5. – 39 с.
8. Sulkowski M. Changes in haemoglobin during interferon alpha-2b plus ribavirin combination therapy for chronic hepatitis C virus infection / M. Sulkowski, R. Wasserman, L. Brooks // Journal Viral Hepatology. – 2004. – № 11. – P. 243-250.
9. Toyoda H. Pharmacotherapy of chronic hepatitis C virus infection – the IDEAL trial: ‘2b or not 2b (=2a), that is the question’ / H. Toyoda, T. Kumada // Expert Opinion on Pharmacotherapy. – 2009. – Vol. 10, № 17. – P. 2845-2857.
10. Weksler B. The pathophysiology of thrombocytopenia in hepatitis C virus infection and chronic liver disease. Aliment. // Pharmacological Therapy. – 2007. – 26. – P. 13-19.

**Рецензенты:**

Николаев Б.Ф., д.м.н., МЛПУЗ «ГБ № 1 им. Н.А. Семашко», г. Ростов-на-Дону;

Яговкин Э.А., д.м.н., Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону.