

*На правах рукописи*

**Борисов Игорь Валерьевич**

**"КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ  
ТЕРАПИИ ГЕНИТАЛЬНОГО ГЕРПЕСА"**

**14.00.11 – кожные и венерические болезни**

**Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук**

**Москва - 2007**

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования "Российский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию"

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, профессор **Уджуху Владислав Юсуфович**

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук, профессор **Суколин Геннадий Иванович**

доктор медицинских наук, профессор **Осипов Сергей Георгиевич**

**Ведущая организация:**

ГОУ ВПО Российский Университет Дружбы Народов

Защита диссертации состоится «19» февраля 2007 г. в 14.00 часов на заседании диссертационного совета К 208.072.03 при Российском государственном медицинском университете по адресу: 117997, Москва, ул. Островитянова, д.1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке РГМУ по адресу: 117997, Москва, ул. Островитянова, д.1

Автореферат разослан «16» января 2007 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета  
доктор медицинских наук, профессор

Л.Ф.Марченко

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

В настоящее время герпес является одной из наиболее распространенных вирусных инфекций человека (Бутов Ю.С., 2002; Haddow L.J., Dave V. et. al., 2006). По данным серологических исследований (Фицпатрик Т., 1999; Самгин М.А., Халдин А.А., 2002), у 80% взрослого населения выявляются антитела к вирусу простого герпеса (ВПГ-1 и ВПГ-2), причем в 6-10% течение герпетической инфекции сопровождается клиническими проявлениями (Кубанова А.А., 2004; Patel R. et. al., 1997). Высокая частота инфицирования вирусом герпеса (Бутов Ю.С., Малиновская В.В., 2000; Cunningham A.L., Taylor J. et. al., 2006) гениталий сексуально активных лиц, вероятность вертикальной передачи вируса от матери к плоду позволяют рассматривать герпес как серьезную медико-социальную проблему (Иванов О.Л. и соавт., 2004). Так, герпетическая инфекция у новорожденных является неконтролируемой причиной перинатальной заболеваемости и смертности (Мирзоян Ж.В., 2001). Иммуногенез герпеса чрезвычайно сложен и недостаточно изучен. Многие стороны его патогенеза дискуссионны. В настоящее время считается, что активация и репликация ВПГ контролируется различными факторами клеточного и гуморального звеньев иммунитета, такими как: цитотоксические Т-лимфоциты, различные интерлейкины и цитокины, сывороточные иммуноглобулины, макрофаги, естественные киллеры и интерфероны (Исаков В.А. и соавт., 1999; Халдин А.А., 2000; Бутов Ю.С., Полеско И.В., 2001). Ряд авторов (Шуршалина А.В., 2001; Сотникова Н.Ю., Кудряшова А.В. и соавт., 2006) считают, что основную функцию контроля за размножением ВПГ в организме выполняет клеточный иммунитет, в частности система интерлейкинов. Другие же (Марченко Л.А., 1997; Исаков В.А. и соавт., 1999) основную роль в формировании противовирусного иммунитета отводят системе естественных клеток киллеров. Вместе с тем ни одна из теорий не позволяет объяснить закономерности нарушений гуморальной регуляции иммун-

ного ответа у больных с герпетической инфекцией, что придает изучению альтерации основных показателей систем макроорганизма ответственных за противовирусную защиту особую актуальность.

Современная химиотерапия герпесвирусных инфекций основывается на избирательном подавлении отдельных звеньев репродукции вирусов без существенного нарушения жизнедеятельности клеток макроорганизма (Исаков В.А. и соавт., 2004; Кубанова А.А., 2004). Однако монотерапия ациклическими нуклеозидами (Егорова Е.А., 2004) во многих случаях не позволяет оптимизировать терапию таким образом, чтобы на длительный период времени у больных сохранялось состояние клинической ремиссии (Томас П. Хебиф, 2006). Частые рецидивы герпесвирусной инфекции определяют необходимость патогенетического лечения (Белозеров Е.С., Буланьков Ю.И., 2005; Кубанова А.А., 2006). Комплексный терапевтический подход в значительной степени повышает клиническую эффективность лечебных мероприятий у больных герпетической инфекцией. В связи с этим перспективным является внедрение новых сочетанных методов лечения больных, включающих ациклические нуклеозиды и новые средства иммуномодулирующей направленности.

### **Цель исследования**

Патогенетически обосновать применение ацикловира, генферона и стемокина, изучить их влияние на показатели иммунитета и оценить клиническую эффективность у больных генитальным герпесом.

### **Задачи исследования**

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

1. Изучить особенности клинического течения герпетического процесса, цитокинопосредованные межклеточные взаимодействия иммунорегуляторных клеток, уровень сывороточных иммуноглобулинов, состояние естественной цитотоксичности и системы интерферона у больных генитальным герпесом как в активной фазе заболевания, так и в период его ремиссии.

2. Исследовать динамику основных показателей интерферонового статуса, активности естественных клеток киллеров и нейтрофильных гранулоцитов у больных генитальным герпесом в процессе применения ацикловира и генферона.

3. Оценить влияние ацикловира и стемокина на субпопуляционный состав лимфоцитов, их функциональное состояние, уровень сывороточных иммуноглобулинов и систему интерлейкинов у больных генитальным герпесом.

4. Провести анализ клинической эффективности комплексного применения ацикловира, генферона и стемокина у больных генитальным герпесом.

### **Научная новизна**

У больных генитальным герпесом установлено снижение эффективности межклеточных взаимодействий иммунокомпетентных клеток, проявляющееся дисбалансом цитокинов, с повышением их активационности на стадии клинических проявлений с последующим формированием иммунодефицита. На всех стадиях течения герпесвирусной инфекции выявлены снижение уровня цитотоксического индекса и диспропорции в системе интерферона на фоне усиления функциональной активности нейтрофилов. Показано, что ацикловир понижает уровень провоспалительных цитокинов и Fas-индуцированный апоптоз лимфоцитов, не препятствуя развитию иммунодефицитного состояния. Использование генферона, оказывая положительное воздействие на систему интерферонов, приводило к повышению интерферона  $\gamma$ , что способствовало стабилизации функциональной активности естественных клеток киллеров и нейтрофильных гранулоцитов. Применение стемокина способствовало нормализации основных показателей клеточного иммунитета и цитокиноопосредованных межклеточных контактов иммунокомпетентных клеток. Патогенетически обоснованный подход к лечению больных генитальным герпесом ацикловиром, генфероном и стемокином обеспечивал развитие клинической ремиссии в 33% случаев на протяжении года и более.

## **Практическая значимость работы**

Уточнен механизм развития генитального герпеса, заключающийся в стойком снижении естественной цитотоксичности, нарушении субпопуляционного состава иммунорегуляторных клеток, диспропорциях в системе интерферона, цитокиновом профиле и усилении продукции свободных радикалов. Впервые разработанный комплексный метод лечения больных генитальным герпесом, включающий применение ацикловира, генферона и стемокина, отличается клинической эффективностью, позволяющей значительно удлинить безрецидивный период заболевания. Разработанные клинико-лабораторные критерии (особенности клинических проявлений, уровень провоспалительных цитокинов, цитотоксический индекс, амплитуды вспышки хемилюминисценции) позволяют прогнозировать дальнейшее течение герпетического процесса и могут применяться для контроля эффективности проводимой терапии. Полученные результаты внедрены в практику работы кафедры кожных и венерических болезней педиатрического факультета ГОУ ВПО РГМУ Росздрава, 4 кожного отделения 52 Городской клинической больницы г. Москвы и клиники «Семейной».

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Установлен факт отклонения от нормы показателей клеточного и гуморального иммунитета у больных генитальным герпесом. Обострения герпетического процесса сопровождались выраженным дисбалансом регуляторных субпопуляций лимфоцитов, нарушением синтеза и экспрессии цитокинов, резким повышением уровня провоспалительных интерлейкинов, компенсаторной гиперактивацией клеточного иммунитета с повышением активационной способности иммунокомпетентных клеток и усиленной продукцией Т-хелперов I порядка. Выявлялись также нарушения в процессах пролиферации и дифференцировки Т-лимфоцитов в виде усиления Fas-индуцированного апоптоза, что свидетельствовало об определенной вирусной нагрузке на макроорганизм. Течение герпетической инфекции характеризовалось также угнетением естест-

венной цитотоксичности, низкой эффективностью межклеточных взаимодействий, выраженными диспропорциями в системе интерферона.

2. Ацикловир, улучшая Fas-индуцированную регуляцию апоптоза Т-лимфоцитов, не предотвращает после регресса клинических проявлений заболевания развития иммунодефицитного состояния. Генферон оказывает стимулирующее действие на такие факторы неспецифической защиты организма как: естественная цитотоксичность, система интерферона. Стемокин обладает коррегирующим действием на клеточные и гуморальные звенья иммунитета, нормализуя цитокиновый профиль и эффективность межклеточных взаимодействий у больных генитальным герпесом.

3. Комплексное лечение, включающее ацикловир, генферон и стемокин у больных генитальным герпесом, обладая высокой клинической эффективностью, значительно улучшает результаты лечения.

### **Апробация работы**

Основные положения диссертации представлены на симпозиуме "Человек и лекарство" (2005), на научно-практических конференциях кафедры кожных и венерических болезней педиатрического факультета ГОУ ВПО РГМУ Росздрава (2005, 2006).

### **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 4 научных работы.

### **Структура и объем диссертации**

Работа изложена на 139 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, 4 глав собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, практических рекомендаций.

Указатель литературы включает 159 работ отечественных и зарубежных авторов. Текст иллюстрирован 22 рисунками и содержит 36 таблиц.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы исследования

#### Лабораторные методы исследования

В работе использовали как общепринятые, так и специальные методы исследования. Назначались комплексные общелабораторные исследования: общий анализ крови, клинический анализ мочи, биохимический анализ крови, УЗИ внутренних органов и др.

Использовался метод иммуноферментного анализа (ИФА) с целью типирования вируса простого герпеса (ВПГ) 1 и 2 типов, а также метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Верификация диагноза генитального герпеса устанавливалась на основании скрининговых методов ИФА и ПЦР.

Клеточное звено иммунитета оценивалось по количественному содержанию лейкоцитов, относительному (%) и абсолютному (в 1 мкл.) содержанию лимфоцитов, Т-лимфоцитов, их иммунорегуляторных субпопуляций. Функциональная активность клеточного звена иммунитета оценивалась по количеству Т-лимфоцитов, экспрессирующих на своей поверхности рецептор к интерлейкину-2 (ИЛ-2), CD25<sup>+</sup> клетки и антигены HLA-DR, а также по их пролиферативной активности при внесении стимуляторов-митогенов. Исследования проводили с помощью моноклональных антител производства НПО «Сорбент» Российского центра аллергологии и иммунологии МЗ России на лазерных цитометрах методом проточной цитофлюорометрии (Facsan, "Becton Dickenson"). Гуморальное звено иммунитета включало комплексную оценку относительного и абсолютного содержания В-лимфоцитов, концентрации иммуноглобулинов классов А, М, G в сыворотке крови, активированных лимфоцитов, экспрессирующих на мембране антигены HLA-DR. В наборе RgoCon для измерения уровней ИЛ-1, ФНО- $\alpha$ , ИЛ-2, ИЛ-4, в сыворотке крови использовался твердофазный иммуноферментный метод с применением пероксидазы хрена в качестве индикаторного фермента.



Интерфероновый статус определяли в соответствии с методическими рекомендациями Минздрава РФ "Определение интерферонового статуса в цельной крови у людей при массовых обследованиях".

Для определения литической активности естественных клеток-киллеров (ЕКК) использовали стандартный Н-уридиновый микроцитотоксический тест.

### **Методы статистической обработки данных**

Для статистической обработки данных использовался персональный компьютер с предустановленной операционной системой Microsoft Windows XP и пакет прикладных программ Microsoft Office 2003 SP-2 (Microsoft Office Word 2003, Microsoft Office Excel 2003). Материалы исследования обрабатывали методом вариационной статистики, используя среднеарифметическое, среднеквадратичное отклонение, критерий Стьюдента и критерий Фишера. Достоверность различий определяли с помощью уровня достоверной вероятности. Парную корреляцию показателей определяли отдельно для каждой группы.

### **Методы лечения**

Была использована следующая схема лечения. Ацикловир внутрь по 200 мг каждые 4 часа 5 раз в сутки на протяжении 5 дней. Одновременно в течение 10 дней применялся генферон в виде ректальных (1000000 МЕ) суппозиторий 2 раза в сутки. Затем в течение 10 дней один раз в сутки внутримышечно вводился 0,01% раствор стемокина.

### **Результаты исследования**

Всего под нашим наблюдением находилось 57 мужчин с генитальным герпесом в возрасте от 19 до 65 лет (табл. 1).

Таблица 1

Распределение больных с герпесом по возрастному составу

Возраст, лет	Мужчины	
	абс.	%
до 30	24	42,1
31-50	21	36,8
51 и старше	12	21,1
Итого:	57	100

У 48 из них генитальный герпес протекал с клиническими проявлениями и у 9 пациентов диагностирована латентная форма заболевания (Рис. 1).

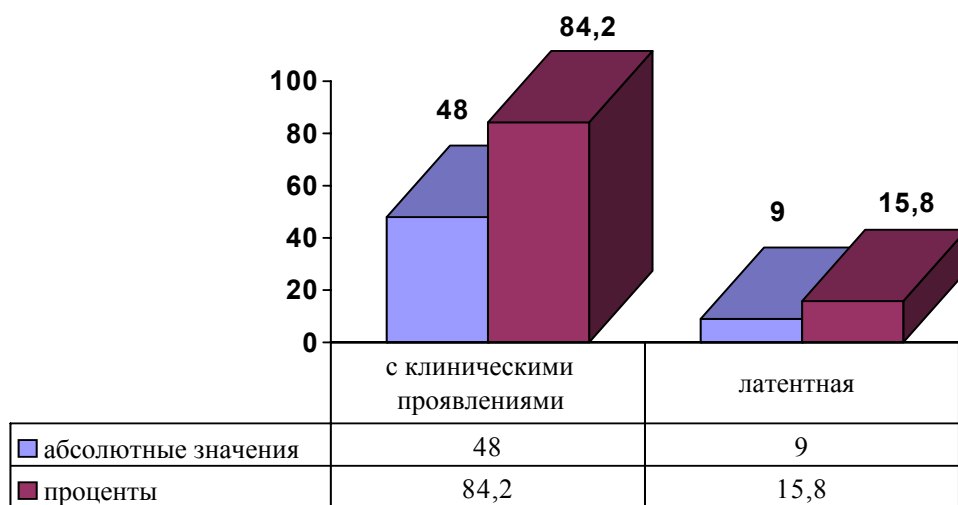


Рис. 1. Распределение больных генитальным герпесом в зависимости от клинической формы заболевания

У большей части пациентов длительность заболевания варьировала от 6 до 10 лет. Наибольший удельный вес среди больных приходился на лиц, у которых рецидивы герпеса возникали 4-6 раз в году. О неблагоприятном течении герпеса свидетельствовало также то, что у 26 пациентов (45,6%) длительность рецидивов превышала 10 дней, а у 15 (26,3%) – более 20 дней. Лишь у 20 больных (35,1%), заболевание было представлено многочисленными сгруппированными пузырьками на гиперемизированном фоне. В других случаях герпес протекал с явлениями инфильтрированной эритемы, глубокими длительно существующими трещинами, папулами, пустулами и единичными везикулами. В ИФА специфические IgG антитела к ВПГ-1 и ВПГ-2 типов обнаружены у 24 и 14 больных соответственно, а суммарные – у 19 пациентов. Методом ПЦР ДНК герпеса ВПГ – 1 типа определена у 39, а ДНК ВПГ – 2 типа – у 15 больных (табл. 2).

## Сравнительные результаты верификации вируса простого герпеса

Тип вируса	Количество больных	Число положительных реакций по данным	
		ПЦР	ИФА
ВПГ-1	57	39	24
ВПГ-2	57	15	14
ВПГ-1 и ВПГ-2	57	0	19
Всего:	57	54	57

Проведенные исследования показали (табл. 3), что у больных с клиническими проявлениями генитального герпеса наблюдалось статистически достоверное увеличение общей популяции Т-лимфоцитов (до  $74,5 \pm 3,8\%$  при  $66,5 \pm 3,7\%$  – у здоровых доноров), а при латентной форме генитального герпеса – снижение концентрации Т-клеток до  $61,1 \pm 3,5\%$ . В то же время выявлено уменьшение CD16+ (NK клетки) до  $12,8 \pm 1,3\%$  у больных с клиническими проявлениями при  $15,0 \pm 1,4\%$  – у здоровых лиц. Концентрация CD95+клеток у больных герпесом значительно превышала аналогичные показатели у здоровых доноров ( $8,9 \pm 0,8\%$  при норме –  $5,0 \pm 0,5\%$ ). У больных с клиническими проявлениями генитального герпеса иммунорегуляторный индекс (ИРИ) оказался значительно повышен по сравнению с таковым у здоровых доноров и составил  $2,6 \pm 0,2\%$ . Такое значение ИРИ было достигнуто за счет значительного повышения в циркулирующей крови уровня Т-хелперов до  $43,5 \pm 3,1\%$  при  $36,5 \pm 3,0\%$  – у здоровых доноров. Вместе с тем, у больных с латентной формой герпеса ИРИ оказался меньше аналогичного показателя в контрольной группе и составил ( $1,7 \pm 0,1\%$ ). Определение Тх1 и Тх2 позволило констатировать значительное увеличение уровня Тх1 у больных с клиническими проявлениями генитального герпеса (до  $31,2 \pm 2,7$  при  $25,1 \pm 2,4\%$  в контрольной группе) на фоне стабильного содержания Тх2.

Показатели фенотипирования лимфоцитов с помощью моноклональных антител у больных генитальным герпесом

Показатель, %	Здоровые доноры (n = 20)	Больные с клиническими проявлениями (n = 48)	Больные с латентным течением (n = 9)
CD3+	66,5±3,7	74,5±3,8*	61,1±3,5*
CD4+	36,5±3,0	43,5±3,1*	32,6±2,8*
CD8+	29,5±2,8	23,9±2,4*	33,5±2,8
CD22+	20,0±1,6	22,6±2,3	17,4±2,0
CD16+	15,0±1,4	12,8±1,3*	12,6±1,3*
CD95+	5,0±0,5	8,9±0,8*	8,0±0,8*
ИРИ	2,1±0,1	2,6±0,2*	1,7±0,1*
CD71+	1,0±0,1	4,4±0,4*	0,6±0,06
Tx1	25,1±2,4	31,2±2,7*	21,1±2,3
Tx2	11,0±1,2	11,9±1,2	11,2±1,2

\* p<0,05 по отношению к здоровым донорам

Среднестатистическая величина индекса супрессии у больных с клиническими проявлениями генитального герпеса оказалась равной 40,6±5,1% при 55,8±6,2% у здоровых доноров. У больных с клиническими проявлениями герпеса содержание Т-лимфоцитов, экспрессирующих как ранние маркеры активации CD25+, CD71+, так и поздние (HLA-DR+клетки) достоверно превышало аналогичные значения у здоровых доноров. При латентной форме герпеса отмечалось снижение уровня активационных процессов, так как ранние и поздние маркеры активации были ниже контрольных значений.

Содержание в периферической крови ИЛ-1β и ФНО-α у больных с клиническими проявлениями герпеса значительно превышало аналогичные показатели в группе здоровых доноров (соответственно 74,1±3,2 и 76,4±3,2 пкг/мл при норме 45,1±2,2 и 50,2±2,4 пкг/мл). При латентном течении герпеса концентрация ИЛ-1β и ФНО-α оказалась ниже соответствующих значений в группе здоровых доноров. Выявлен также высокий уровень синтеза ИЛ-2 мононуклеарами у больных с клиническими проявлениями герпеса. Вместе с тем при латентной

форме выявлялось снижение как спонтанной, так и индуцированной продукции ИЛ-2 мононуклеарами. ИЛ-4 в сосудистом русле больных с герпесом определялся лишь в следовых количествах. У больных с клиническими проявлениями герпеса выявлено статистически достоверное снижение средних уровней сывороточного ИФН (табл. 4). Продукция IFN- $\alpha$  в процессе индукции вирусом болезни Ньюкасла (ББН) оказалась достоверно сниженной до  $37,7 \pm 1,1$  Е/мл при норме –  $80,4 \pm 1,4$  Е/мл. Анализ динамики показателей титров IFN в ответ на введение циклоферона выявил существенное снижение порога чувствительности к нему по сравнению с группой здоровых доноров ( $39,9 \pm 1,1$  Е/мл при норме  $64,0 \pm 1,4$  Е/мл). Продукция IFN- $\gamma$  лейкоцитами на введение ФГА у больных с клиническими проявлениями герпеса оказалась достоверно ниже показателей в группе доноров ( $19,8 \pm 1,7$  Е/мл и при норме  $34,3 \pm 4,3$  Е/мл). У больных с латентной формой герпеса отмечен более выраженный дисбаланс в системе интерферона.

Таблица 4

Интерфероновый статус у больных с различными разновидностями герпеса

Показатель, Е/мл	Больные с клиническими проявлениями герпеса (n=20)	Больные с латентной формой герпеса (n=8)	Здоровые доноры (n=20)
Сывороточный IFN	$2,9 \pm 0,5^*$	$3,2 \pm 0,4^*$	$5,2 \pm 0,6$
Спонтанная IFN реакция лейкоцитов	$5,5 \pm 0,3$	$4,7 \pm 0,2$	$4,1 \pm 0,04$
Продукция лейкоцитами IFN- $\alpha$ при индукции ББН	$37,7 \pm 1,1^*$	$22,6 \pm 0,9^*$	$80,4 \pm 1,4$
Продукция IFN- $\alpha/\beta$ на введение циклоферона	$39,9 \pm 1,1^*$	$24,2 \pm 0,5^*$	$64,0 \pm 1,4$
Продукция лейкоцитами IFN- $\gamma$ при индукции ФГА	$19,8 \pm 1,7^*$	$12,8 \pm 1,0^*$	$34,3 \pm 4,3$

\*  $p < 0,05$  по отношению к здоровым донорам

Так, воспроизводство лейкоцитами IFN- $\alpha$  при индукции ББН и продукция IFN- $\gamma$  при индукции ФГА уменьшалось в среднем до  $22,6 \pm 0,9$  Е/мл и  $12,8 \pm 1,0$  Е/мл соответственно. Продукция IFN- $\alpha/\beta$  на введение циклоферона достоверно снижалась до  $24,2 \pm 0,5$  Е/мл.

Функциональная активность естественных клеток киллеров (ЕКК) у больных как с клиническими проявлениями герпеса, так и с латентным течением была значительно снижена по сравнению с аналогичными цифрами у здоровых доноров (табл. 5).

Таблица 5

Активность естественных клеток-киллеров (ЕКК) у больных с различными формами генитального герпеса и здоровых доноров

Больные с генитальным герпесом	Показатель			
	n	ЦИ, %	P <	Характеристика ЕКК
с клиническими проявлениями	29	$38,1 \pm 2,2$	< 0,05	гипофункция
латентная	7	$40,1 \pm 2,4$	< 0,05	гипофункция
Контрольная группа	10	$50,1 \pm 3,1$	–	–

Среднее значение амплитуды вспышки хемилюминесценции (ХЛ) у больных с герпесом оказалось статистически выше аналогичного показателя в группе здоровых доноров ( $2,3 \pm 0,5$  квант/с x 4л при норме –  $1,9 \pm 0,3$  квант/с x 4 л).

Таким образом, проведенные исследования показали, что у больных с генитальным герпесом на всех этапах заболевания прослеживалось значительное снижение неспецифической резистентности организма в виде функциональной недостаточности ЕКК и выраженного дисбаланса в системе интерферона.

При латентном течении герпесвирусной инфекции наблюдалась также недостаточность клеточных и иммунорегуляторных механизмов иммунной системы. Вместе с тем избыточное выделение свободных радикалов, провоспалительных интерлейкинов и протеолитических ферментов активированными ней-

трофилами, выходя за рамки протективного иммунитета, приводило к развитию экссудативно-деструктивного воспаления.

Проведённые исследования показали, что уровень В-лимфоцитов в целом по группе больных с герпесом составил  $21,4 \pm 2,2\%$  при норме  $20,0 \pm 1,6\%$ . Определены существенные изменения по сравнению с группой здоровых доноров в продукции сывороточных иммуноглобулинов различных классов, характеризовавшиеся повышением в сосудистом русле иммуноглобулинов G.

Таким образом, проведенные исследования выявили патогенетическую значимость выявленных нами нарушений со стороны иммунного гомеостаза и неспецифической резистентности организма у больных генитальным герпесом и наглядно показали необходимость проведения у них лечебных мероприятий иммуномодулирующей направленности.

Под воздействием генферона произошло статистически достоверное повышение функциональной активности ЕКК как у больных с клиническими проявлениями герпеса, так и у лиц с латентной формой заболевания. Цитотоксический индекс по окончании лечения практически не отличался от аналогичных цифр у здоровых доноров.

Положительное влияние данная терапия оказывала и на течение свободнорадикальных процессов у больных герпесом. Под влиянием генферона существенно уменьшилась продукция активных форм кислорода нейтрофильными лейкоцитами. Среднее значение амплитуды вспышки ХЛ у больных герпесом, статистически достоверно понизилось и к моменту окончания лечения практически не отличалось от аналогичных цифр у здоровых доноров ( $2,3 \pm 0,5$  квант/с х  $4\pi$  - в исходном фоне и  $1,8 \pm 0,3$  квант/с х  $4\pi$  – после лечения). Проведенные исследования показали, что в процессе применения генферона у больных герпесом наблюдалось статистически достоверное повышение средних уровней сывороточного ИФН. Наиболее выраженные изменения под влиянием генферона выявлены в индуцированной продукции лейкоцитами IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  и IFN- $\gamma$ . Воспроизводство IFN- $\alpha$  в процессе индукции вирусом болезни Ньюкасла (ББН)

значительно повысилось и составило в среднем по группе больных с герпесом  $75,3 \pm 1,4$  Е/мл при  $30,2 \pm 0,6$  Е/мл – в исходном фоне. Показатели титров IFN- $\alpha/\beta$  в ответ на введение индуктора IFN – циклоферона, свидетельствовали о значительном повышении порога чувствительности к нему по сравнению с таковой у больных герпесом до лечения (соответственно  $32,1 \pm 0,4$  Е/мл и  $57,5 \pm 0,4$  Е/мл). Продукция IFN- $\gamma$  лейкоцитами на введение ФГА в процессе применения генферона значительно выросла и достигла аналогичных показателей у здоровых доноров ( $31,6 \pm 4,0$  Е/мл и  $34,3 \pm 4,3$  Е/мл соответственно).

Таким образом, на основании результатов проведенных исследований можно сделать вывод о том, что генферон значительно повышает эффективность противовирусного иммунного ответа, устраняя дисбаланс в системе интерферона и нормализуя функциональную активность ЕКК и нейтрофильных лейкоцитов.

Иммунологические исследования, проведенные в процессе применения стемокина, показали, что наиболее значительные изменения наблюдались в системе клеточного иммунитета. Выявлено, что у больных герпесом в процессе лечения происходило значительное увеличение концентрации Т-лимфоцитов. Повышался также и ИРИ. Однако к моменту окончания лечения стемокином относительное содержание Т-лимфоцитов, Т-хелперов, а также ИРИ, снизившись, практически не отличались от аналогичных значений у здоровых доноров. Среднестатистическая величина индекса супрессии на 2 день лечения стемокином оказалась равной  $39,5 \pm 5,0\%$  при аналогичных цифрах у здоровых доноров –  $55,8 \pm 6,2\%$ . На дальнейших этапах терапии стемокином и после ее окончания наблюдалось повышение супрессорной функции лимфоцитов (до  $45,9 \pm 6,3\%$ , при  $55,8 \pm 6,2\%$  – у здоровых доноров). Проведенные исследования показали также, что под влиянием стемокина увеличивалось количество клеток, экспрессирующих рецепторы к ИЛ-2 и HLA-DR как у больных с клиническими проявлениями герпеса, так и при латентном течении заболевания. Количество CD71+ в эти же сроки увеличилось с  $4,4 \pm 0,4\%$  до  $6,9 \pm 0,4\%$ . Таким образом,



проведённые исследования показали, что в процессе применения стемокина происходило нарастание активационной способности Т-лимфоцитов. На ранних этапах применения стемокина у больных герпесом наблюдалось повышение уровня ИЛ-1 $\beta$  и ФНО- $\alpha$ , пик которого приходился на 5 день терапии. На дальнейших этапах терапии наблюдалось уменьшение уровня данных цитокинов. Тем не менее, их концентрация к моменту окончания лечения превышала значение аналогичных данных у здоровых доноров. В процессе применения стемокина у больных герпесом наблюдалось повышение как спонтанной, так и индуцированной продукции моноклеарами ИЛ-2. В дальнейшем наблюдалось плавное снижение данных показателей. Однако если к моменту окончания лечения стемокином индуцированная продукция ИЛ-2 практически не отличалась от показателей в группе здоровых доноров, то спонтанный синтез ИЛ-2 статистически достоверно превышал аналогичные цифры в группе здоровых доноров. На 5 день проводимой терапии в сыворотке крови стал определяться ИЛ-4 ( $30 \pm 1,1$  пкг/мл). В процессе проводимой терапии у больных герпесом наблюдалось также статистически достоверное уменьшение в кровеносном русле уровня IgG.

Таким образом, проведенные клинико-лабораторные исследования выявили высокую тропность стемокина к иммунокомпетентным клеткам. Применение стемокина предотвращало возникновение иммунодефицитного состояния, характерного для больных с генитальным герпесом в период ремиссии заболевания.

Применение ацикловира у больных с клиническими проявлениями герпеса привело к уменьшению иммунорегуляторного индекса по сравнению как с исходным фоном, так и с таковым у здоровых доноров (соответственно с  $2,6 \pm 0,2$  до  $1,6 \pm 0,1$  при норме  $2,1 \pm 0,1$ ). В процессе терапии ацикловиrom наблюдалось существенное снижение мембранной рецепции лимфоцитов к ИЛ-2 и HLA-DR, а также значительное уменьшение количества CD95+клеток с  $8,9 \pm 0,8\%$  до  $5,3 \pm 0,5\%$ . Полученные данные свидетельствовали о нормализации

пролиферации Т-лимфоцитов и значительном уменьшении вирусной нагрузки на организм. В процессе применения ацикловира у больных герпесом наблюдалось снижение концентрации в сосудистом русле провоспалительных цитокинов. Вследствие этого после лечения содержание ИЛ-1 $\beta$  и ФНО- $\alpha$  в крови было ниже аналогичных показателей у здоровых доноров. Вместе с тем функциональная активность ЕКК повышалась незначительно и статистически достоверно была ниже таковой у здоровых доноров ( $40,2 \pm 2,5\%$  при  $50,1 \pm 3,1\%$ ). Применение ацикловира не оказывало существенного воздействия на состояние интерферонового статуса и функциональную активность нейтрофильных лейкоцитов у больных генитальным герпесом.

Результаты проведенных клинико-лабораторных исследований явились основанием для разработки методики применения комплексной терапии, включавшей ацикловир, генферон и стемокин, которую получал 21 пациент (1 группа). Терапевтическая эффективность применения генферона прослежена в общей сложности у 12 больных (2 группа), стемокина – у 12 пациентов с герпес-вирусной инфекцией (3 группа), а 12 больных составили группу контроля и получали монотерапию ацикловиром (4 группа). Оценка эффективности терапии больных генитальным герпесом, получавших различные виды лечения, проводилась по трех бальной системе с учетом динамики субъективных ощущений и клинических симптомов заболевания. Учитывалась выраженность субъективных ощущений (зуд, жжение, болезненность), симптомов интоксикации (слабость, адинамия). Клинических симптомов: количество очагов, площадь поражения, выраженность гиперемии, регионарного лимфаденита, количество везикул, пустул, эрозий, язв, корочек. Согласно сводным данным по группам был проведен анализ и математическая обработка полученных данных о клинической эффективности использованных в работе лечебных методик. Эволюция клинических проявлений заболевания у пациентов, получавших различные методы лечения, была схожей. Уже в первые сутки лечения у больных исчезали или значительно уменьшались зуд и жжение в области очагов поражения, были

купированы слабость и недомогание. В этот же период времени прекращалось появление свежих везикул, значительно уменьшалась яркость воспалительных пятен. В последующие дни наблюдалась эпителизация эрозивных дефектов и отторжение корочек, что позволило добиться клинической ремиссии заболевания. Проведенные исследования показали, что наиболее быстрый регресс клинических проявлений генитального герпеса наблюдался у больных, получавших комплексное лечение ацикловиром, генфероном и стемокином.

Так, согласно бальной системе интенсивность клинических проявлений генитального герпеса на 5 день лечения у больных 1 группы уменьшилась более чем в 12 раз, у больных 2 группы – более чем в 5 раз, у больных 3 группы – в 4 раза, у больных 4 группы – в 4,5 раза (рис. 2).

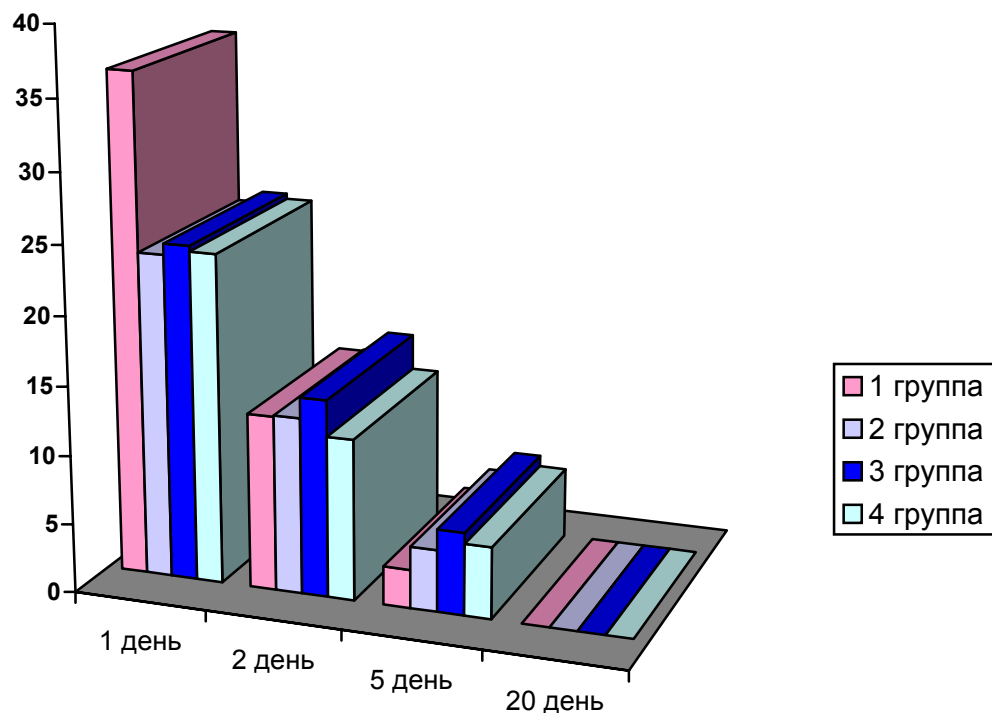


Рис. 2. Оценка эффективности различных методов лечения больных генитальным герпесом

В процессе лечения больных генитальным герпесом с использованием различных методик каких либо побочных действий и осложнений не выявлено.

При повторной детекции возбудителей методом полимеразной цепной реакции и иммуноферментного анализа после проведенного лечения результаты ПЦР в большинстве случаев оказались отрицательными. Анализ катмнеза показал, что наиболее благоприятные результаты прослеживались в группе пациентов, получавших комплексное лечение. Так, состояние стойкого клинического выздоровления сохранилось у 7 пациентов (33%) свыше года, причем у одного из них рецидивов герпеса не наблюдалось на протяжении двух и более лет. Ни в одном случае не зафиксировано повторное развитие герпетического процесса в сроки от одного до трех месяцев (Рис. 3).

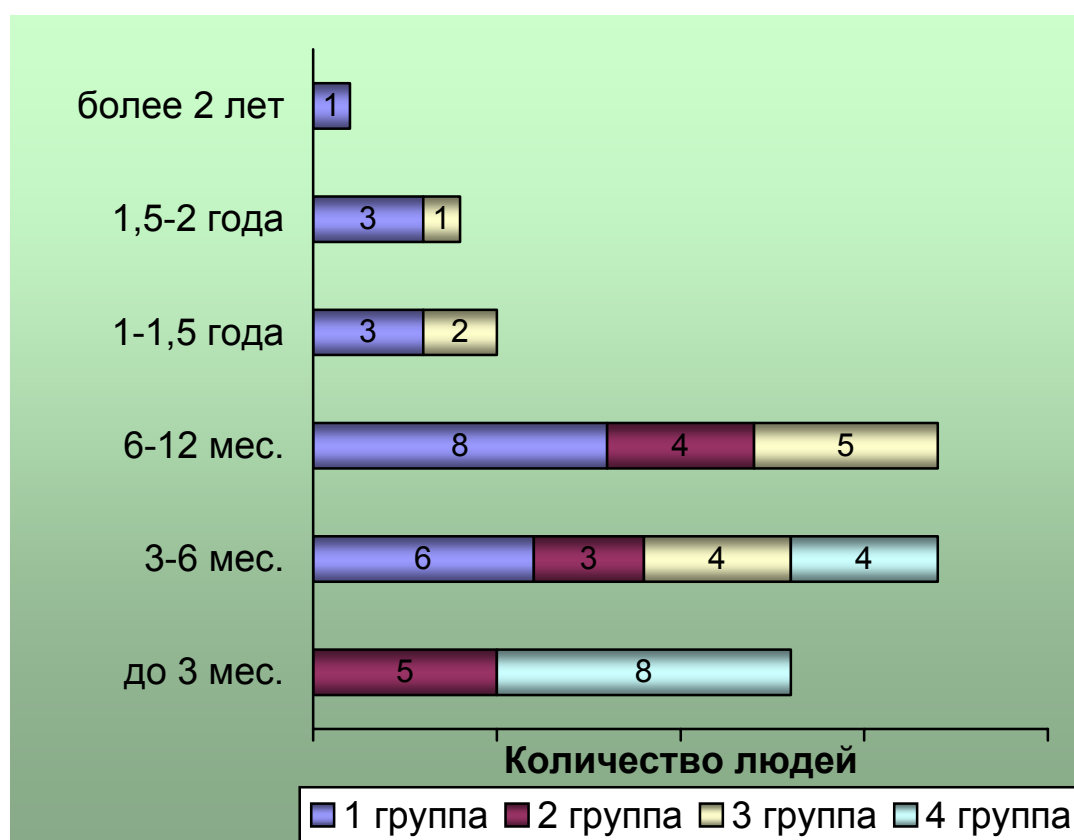


Рис.3. Результаты катмнеза у больных, получавших различные методы лечения

Рецидивы герпетического процесса в 76% случаев протекали более мягко в виде слабой эритемы и быстро эволюционирующих единичных везикул. Как правило, в таких случаях повторное назначение комплексного лечения позволяло купировать клинические проявления заболевания. Аналогичные исследования у больных, леченных стемокином, показали, что клиническая ремиссия

во временном интервале от одного до двух лет наблюдалась у трех пациентов (25%). Причем, наибольшее число обострений герпетического процесса после проведенного лечения стемокином приходилось на временной интервал от 6 месяцев до года (42%). Менее благоприятные результаты прослеживались в группе больных, получавших генферон. Так, рецидивы герпеса в сроки от одного до трех месяцев наблюдались у пятерых пациентов (42%) этой группы. Динамические наблюдения за больными, получавшими ацикловир, показали, что монотерапия не оказала существенного влияния на последующее течение герпетического процесса.

## ВЫВОДЫ

1. Генитальный герпес нередко характеризовался атипичным течением, частыми обострениями, большой длительностью, резистентностью к монотерапии ациклическими нуклеозидами. На стадии клинических проявлений герпеса отмечалось преобладание активационных процессов, о чем свидетельствовали прирост экспрессии маркеров активации CD25+, CD71+ и HLA-DR, а также среднестатистическая величина индекса супрессии -  $40,6 \pm 5,1\%$  при  $55,8 \pm 6,2\%$  у здоровых доноров. Нарушения цитокинопосредованных межклеточных взаимодействий протекали с преобладанием продукции провоспалительных интерлейкинов (ИЛ-1 $\beta$  и ФНО- $\alpha$  составляло соответственно  $74,1 \pm 3,2$  и  $76,4 \pm 3,2$  пкг/мл при норме  $45,1 \pm 2,2$  и  $50,2 \pm 2,4$  пкг/мл). Наблюдалось угнетение естественной цитотоксичности (цитотоксический индекс -  $38,0 \pm 2,2\%$  при норме -  $50,1 \pm 3,1\%$ ), дисбаланс в системе интерферона и повышение продукции свободных радикалов. В скрытый период заболевания выявлялись угнетение иммунорегуляторного механизма в виде снижения концентрации Т-лимфоцитов до  $61,1 \pm 3,5\%$  при норме  $66,5 \pm 3,7\%$ , иммунорегуляторного индекса до  $1,7 \pm 0,1$  при  $2,1 \pm 0,1$  у здоровых доноров, а также дисфункциональное состояние гуморального звена иммунитета.

2. Терапия генфероном направлена на оптимизацию процессов естественной цитотоксичности (увеличение цитотоксического индекса с  $38,1 \pm 2,2\%$  до

46,2±2,5%), уменьшение продукции свободных радикалов. В процессе лечения генфероном наблюдалась нормализация состояния системы интерферона, выражавшаяся усилением индуцированной продукции лейкоцитами IFN- $\alpha$  до 75,3±1,4 Е/мл при 30,2±0,6 Е/мл – в исходном фоне; IFN- $\alpha/\beta$  с 32,1±0,4 Е/мл до 57,5±0,4 Е/мл и IFN- $\gamma$  до 31,6±4,0 Е/мл при 34,3±4,3 Е/мл – у здоровых доноров. Применение ацикловира не оказало существенного воздействия на состояние интерферонового статуса, функциональную активность нейтрофильных лейкоцитов и естественных клеток киллеров.

3. Применение стемокина у больных генитальным герпесом приводило к нормализации основных показателей Т-клеточного звена иммунитета: содержания Т-лимфоцитов, Т-хелперов, иммунорегуляторного индекса, супрессорной и активационной способности Т-клеток. Лечение стемокином устраняло дисбаланс в синтезе цитокинов: у больных с клиническими проявлениями содержание ИЛ-1 $\beta$  с 74,1±5,4 пкг/мл уменьшалось до 51,1±5,1 пкг/мл; ФНО- $\alpha$  – с 76,3±5,5 пкг/мл до 58,4±5,1 пкг/мл, а у больных с латентной формой концентрация ИЛ-1 $\beta$  увеличивалась с 38,2±3,7 пкг/мл до 49,3±4,1 пкг/мл; ФНО- $\alpha$  – с 40,5±3,9 пкг/мл до 54,3±5,1 пкг/мл. Применение стемокина привело к нормализации содержания иммуноглобулина G. Ацикловир оказывал стабилизирующее воздействие на Fas-индуцированную регуляцию апоптоза Т-лимфоцитов (уменьшение количества CD95+клеток с 8,9±0,8% до 5,3±0,5%), приводил к уменьшению иммунорегуляторного индекса, уровня провоспалительных цитокинов.

4. Разработанный, патогенетически обоснованный метод лечения больных генитальным герпесом, включающий применение ацикловира, стемокина и генферома, привел к выраженному сокращению частоты (до 1-2 раз в год) и длительности (до 1-3 дней) рецидивов генитального герпеса.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. При обследовании больных генитальным герпесом рекомендовано использование иммунологических тестов к дифференцировочным и активацион-

ным маркерам иммунокомпетентных клеток.

2. Выявленная высокая клиническая эффективность ацикловира, генферона и стемокина позволяет рекомендовать данный вид комплексной терапии при различных клинических вариантах течения генитального герпеса.

3. В процессе проведения комплексной терапии, включающей ацикловир, генферон и стемокин, рекомендуется мониторинг состояния цитокинового профиля и системы интерферона.

### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Уджуху В.Ю., Короткий Н.Г., Борисов И.В., Казакова М.А. Комплекс ацикловир – генферон в терапии генитального герпеса. // Вопросы дерматологии, косметологии, клинической микологии и инфекций, передаваемых половым путем: научно-практическая конференция. – М., 2005. – С. 111.

2. Уджуху В.Ю., Кубылинский А.А., Борисов И.В. Первый опыт применения неогена и генферона у больных с герпетической инфекцией //Актуальные вопросы клинической медицины: сборник научных трудов, посвященный 50-летию городской клинической больницы №52 Департамента здравоохранения г. Москвы. – М., 2005. – С. 277-278.

3. Уджуху В.Ю., Кубылинский А.А., Борисов И.В. Состояние иммунного статуса у больных с герпетической инфекцией //Актуальные вопросы клинической медицины: сборник научных трудов, посвященный 50-летию городской клинической больницы №52 Департамента здравоохранения г. Москвы. – М., 2005. – С. 278-279.

4. Уджуху В.Ю., Короткий Н.Г., Борисов И.В. Комплексная терапия генитального герпеса, включающая неоген и генферон //Клиническая дерматология и венерология. – М.: Медицинский центр, 2006. – №2. – С. 32-35.