

ХИТРИК НАДЕЖДА МАРКОВНА

**ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ФАГОЦИТОВ У
БОЛЬНЫХ С ИНФЕКЦИЕЙ, ВЫЗВАННОЙ ВИРУСОМ
ПРОСТОГО ГЕРПЕСА.**

14.00.36 – Аллергология и иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

МОСКВА, 2007 г.

Работа выполнена в ФГУ «Научно-исследовательский институт физико-химической медицины Росздрава» (директор – академик РАМН, доктор медицинских наук, профессор В.И.Сергиенко).

Научный руководитель:

Доктор медицинских наук, профессор

Дидковский Николай Антонович

Официальные оппоненты:

Доктор биологических наук, профессор

Захарова Людмила Алексеевна

Доктор медицинских наук, профессор

Калюжин Олег Витальевич

Ведущая организация:

Государственное образовательное учреждение Московский Государственный медико-стоматологический Университет Росздрава.

Защита диссертации состоится «___» мая 2007 года.

В _____ часов на заседании диссертационного совета Д.208.057.02 при ФГУ «НИИ физико-химической медицины Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»

по адресу: 119992, Москва, ул. М.Пироговская, 1А.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУ «НИИ физико-химической медицины Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»

Реферат разослан «___» ___ апреля __2007 года

Ученый секретарь диссертационного совета,

кандидат биологических наук

Л.Л. Васильева

Актуальность темы.

В настоящее время наблюдается тенденция к широкому распространению различных заболеваний, вызванных герпес – вирусами. Рецидивирующие герпетические инфекции наблюдаются у 9-15% жителей разных стран (Drake AL, et al., 2007; Xu F, Sternberg MR, et al., 2006; Bunzli D, et al., 2004; Tran, T. et al., 2004.). Эти инфекции, передаваемые воздушно-капельным путем, через предметы обихода, половым путем, а также от матери к ребенку (во время родов) и т.д., называют "инфекциями цивилизации". По данным ВОЗ, заболевания, передаваемые вирусами герпеса занимают 2-е место (15,8%) после гриппа (35,8%), как причина тяжелых осложнений от вирусных инфекций. На территории России и в странах СНГ от хронической герпетической инфекции страдает более 25 миллионов человек. Число лиц, вновь инфицированных генитальным герпесом, ежегодно в РФ возрастает более чем на 10% (Мокиева М.В., 2006.).

Клинически герпесвирусная инфекция, вызванная вирусами простого герпеса (ВПГ1,2) проявляется в виде поражения кожи, полости рта, глаз (Baier D, et al., 2001), генитального тракта и генерализованного герпеса новорожденных (Xu F, Markowitz LE, et al., 2007). Доказано, что у больных с хроническими герпетическими инфекциями значительно чаще развиваются онкологические заболевания (Гребенюк В.Н. и соавт., 1981.), аутоиммунные заболевания, бесплодие, патология плода (Рахманова А.Г., и соавт., 2001). Вирусы герпеса индуцируют процессы атеросклероза, влияют на процесс психического развития человека, могут вызывать патологию нервных клеток (Деконенко Е.П., 2002; Livicova N. E. et al., 1985). Патогенез герпетической инфекции является иммуноопосредованным (Verjans GM, et al. 2007.; Kwok W.W. et al., 2000; Кунгуров Н.В., и соавт., 2001.). Хроническая герпесвирусная инфекция, представляет собой трудную проблему, все еще далекую от своего решения. Это объясняется широкой распространенностью заболевания, недостаточной эффективностью, длительностью и дорогостоящей существующих методов лечения. Установлено, что около 90% городского населения во всех странах мира, инфицировано одним или несколькими серовариантами герпесвирусов. Причем антитела к ВПГ-1 выявляются у 99%, а к ВПГ-2 у 73% населения (Devillechabrolle A. et al. , 1985.; Ross J.D. et al., 1993.). Клинические проявления имеют 10-25%

инфицированных, а рецидивирующими формами страдают от 2 до 12% (Козлова В.И., и соавт., 1995.; Масюкова С.А., и соавт., 2000.).

В научной литературе имеется ряд работ, посвященных исследованию состояния клеточного и гуморального звена иммунитета у больных ВПГ-инфекцией (Rouse BT, et al., 2006; Robertson SJ, et al., 2006; Sainz B Jr, et al., 2002). Однако недостаточно работ с анализом состояния иммунной системы у больных ВПГ инфекцией с частыми рецидивами (более 7 раз в год). Крайне мало работ, посвященных комплексной оценке функциональной активности нейтрофилов при этих инфекциях. В экспериментах на животных была показана важная роль нейтрофилов периферической крови в противовирусной защите (Araki-Sasaki K, et al., 2006; Yan XT, et al., 1998). Комплексное изучение функциональной активности нейтрофилов у больных ВПГ, имеет значение для выяснения роли этих нарушений в патогенезе заболевания. Кроме того, полученные результаты, могут быть использованы для повышения эффективности терапии таких больных. На данный момент, в лечение ВПГ используются много иммуностропных препаратов, однако их назначение, как правило, эмпирическое и часто недостаточно эффективно. Практически нет работ по изучению методов подбора препаратов и прогнозированию их воздействия на систему нейтрофилов.

Таким образом, изучение функционального состояния и особенностей патологии нейтрофилов, у больных, страдающих герпетической инфекцией, вызванной вирусом простого герпеса 1 и 2 типов тяжелого течения (ГИ ВПГ1,2), а также разработка тестов индивидуального подбора иммуномодуляторов *in vitro*, представляет значительный научный и практический интерес.

Медико-биологическая и социальная значимость проблемы герпетической инфекции, недостаточная изученность многих вопросов патогенеза, необходимость повышения эффективности лечения, послужили основанием для проведения данной работы.

Цель исследования:

Изучить состояние основных функций нейтрофилов и особенности их нарушения у больных, страдающих инфекцией, вызванной вирусами простого герпеса 1 и 2 типа тяжелого течения, и оценить влияние иммуномодулятора и

индуктора синтеза интерферона - циклоферон в тесте *in vitro*, и после курса терапии, для возможного применения с целью коррекции дисфункций нейтрофилов у данной категории больных.

Задачи исследования:

1. Изучить кислородзависимую бактерицидность нейтрофилов у больных страдающих инфекцией, вызванной вирусами простого герпеса 1 и 2 типа тяжелого течения по уровню активных форм кислорода в НСТ-тесте.
2. Изучить состояние активности миелопероксидазы нейтрофилов у больных страдающих инфекцией, вызванной вирусами простого герпеса 1 и 2 типа при тяжелом течении заболевания.
3. Изучить состояние кислороднезависимой бактерицидности нейтрофилов у больных страдающих инфекцией, вызванной вирусами простого герпеса 1 и 2 типа тяжелого течения, путем оценки уровня катионных белков.
4. Изучить фагоцитарную и переваривающую способность нейтрофилов у больных, страдающих инфекцией, вызванной вирусами простого герпеса 1 и 2 типа тяжелого течения.
5. Оценить влияние курсового лечения циклофероном на состояние функциональной активности нейтрофилов у больных, с инфекцией, вызванной вирусами простого герпеса 1 и 2 типа тяжелого течения.

Научная новизна.

Впервые было проведено комплексное исследование бактерицидной функции нейтрофилов, выявлены нарушения их функциональной активности у больных страдающих инфекцией, вызванной вирусами простого герпеса 1 и 2 типа тяжелого течения. Показано модулирующее действие курса терапии препаратом циклоферон на измененные показатели функциональной активности нейтрофилов.

Практическая значимость.

Выявлены значительные нарушения функциональной активности нейтрофилов у больных страдающих инфекцией, вызванной вирусами простого герпеса 1 и 2 типа тяжелого течения. В процессе работы была показана

возможность и целесообразность коррекции выявленных нарушений функций нейтрофилов препаратом циклоферон.

Внедрение результатов исследования в практику.

Результаты исследования используются в повседневной работе в Городской клинической больнице №7 г. Москвы.

Структура и объем работы.

Диссертация изложена на 132 страницах, иллюстрирована 40 таблицами и 23 рисунками. Диссертация состоит из введения и глав: обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение и результаты, выводы. Библиографический указатель включает 126 источников.

Апробация работы.

Диссертация апробирована на межкафедральной и межлабораторной научной конференции лаборатории клинической иммунологии ФГУ НИИ ФХМ Росздрава и кафедры клинической иммунологии ФППО ММА им. И.М.Сеченова.

Материалы диссертации были представлены:

- На II всемирном конгрессе по иммунопатологии и аллергологии. (Москва, 14-17 мая 2004г).
- На II международной научной конференции «Современные аспекты реабилитации в медицине».(Ереван, 2005г).
- На итоговой научной конференции 2005 года в ФГУ «НИИ ФХМ Росздрава»

Основные положения выносимые на защиту:

1. В большинстве случаев у больных страдающих инфекцией, вызванной вирусами простого герпеса 1 и 2 типа тяжелого течения, выявлены нарушения в кислородзависимой и кислороднезависимой бактерицидных системах нейтрофилов.

2. Установлено существенное снижение поглотительной и переваривающей способности нейтрофилов, у больных с тяжелым течением инфекции, вызванной вирусами простого герпеса 1 и 2 типа.
3. Курсовое применение индуктора синтеза интерферона препарата циклоферон оказывает нормализующее влияние на функциональную активность нейтрофилов.

Публикации.

По теме диссертации опубликованы 11 печатных работ: 2 статьи в центральной печати и 9 тезисов.

Статистическая обработка данных.

Данные, полученные в результате исследования, были статистически обработаны общепринятыми методами на ПК с использованием стандартных программ: «Statgraphics for Windows 2000», «Microsoft Excel». В качестве статистических тестов использовали:

- t-критерий Стьюдента для нормального распределения
- коэффициент корреляции Пирсона
- критерий Вилкосона-Мана-Уитни, для небольших групп

Критическим уровнем значимости при проверке статистических гипотез считали $p < 0,05$.

Содержание работы.

Общая характеристика собственных наблюдений и методов исследования.

Проведено проспективное открытое исследование. В исследование включались больные с установленным диагнозом герпетическая инфекция, вызванная вирусами простого герпеса 1 и 2 типов тяжелого течения.

Обследовали 65 больных (27 мужчин, 38 женщин), страдающих герпетической инфекцией, вызванной вирусами простого герпеса 1 и 2 типа (ГИ

ВПГ1,2) тяжелого течения с частотой от 6 до 20 рецидивов в год (не менее 2-х лет).

Критериями включения пациентов в исследование являлось:

- наличие клинических проявлений ГИ ВПГ1,2 типа: поражения кожи, полости рта, слизистой носа, глаз, уро-генитального тракта;
- длительность течения заболевания ГИ ВПГ1,2 типа не менее 2 лет;
- возраст от 18 до 65 лет;
- отсутствие тяжелых сопутствующих заболеваний и других состояний изменяющих параметры иммунного статуса.
- количество рецидивов не менее 6 в год.

Характеристика больных представлена в таблице 1.

Таблица 1.

Характеристика обследованных больных с диагнозом хроническая ВПГ инфекция первого и второго типа и пациентов контрольной группы.

	Основная группа (65 чел)	Контрольная группа (60 чел)
Возраст	35 ± 1,5 лет	32 ± 1,6 лет
Мужчины	27 чел	27 чел
Женщины	38 чел	33 чел
Длительность заболевания	8,5 ± 0,42 лет	нет
	Частота рецидивов ВПГ в год	
6 - 8 рец/год	20 чел	нет
9 - 11 рец/год	20 чел	нет
12 и более рец/год	25 чел	нет
	Локализация ВПГ высыпаний	
Лабиальный герпес	18 чел	нет
Генитальный герпес	24 чел	нет
Сочетанный (генитальный и лабиальный) герпес	23 чел	нет

Дизайн исследования

Больным, которые соответствовали критериям включения, исходно было проведено исследование функциональной активности нейтрофилов (НФ) (спонтанной активности и проба с препаратом циклоферон *in vitro*). После курсового лечения циклофероном (циклоферон принимали в таблетированной

форме в дозе 5 мг/кг один раз в 3 дня, всего 10 приемов) проводили повторное обследование.

Очевидно, что адгезивная способность фагоцитирующих клеток у людей индивидуальна. Соответственно, полученные величины оптической плотности в НСТ-тесте, при тестировании активности миелопероксидазы и количество катионных белков зависят не только от функционального состояния клеток, но и от их количества прилипших к пластику. Для стандартизации полученных в тестах показателей и сравнения полученных результатов у разных людей, проводили перерасчет показателей на 100 тысяч клеток.

Методы оценки функциональной активности нейтрофилов:

- ***Определение количества адгезированных клеток.***

Для каждого больного определяли количество адгезированных в лунке клеток. Для этого в лунку плоскодонного планшета вносили 50 мкл цельной крови, кровь инкубировали в течение 60 мин при $t=37$ и непрерывном встряхивании (условия инкубации как при определении НСТ, МПО и КБ) далее пробу отмывали, прилипшие клетки «отщепляли» раствором уксусной кислоты и подсчитывали в камере Горяева. Проводили перерасчет показателей на 100 тысяч клеток - величина оптической плотности умножается на 100 тысяч клеток и делится на количество адгезированных клеток.

$$\text{усл.ед} = \frac{\text{оптич. плотн} \times 100\,000}{\text{количество адгезированных клеток в лунке}}$$

Полученный результат использовался при обработке результатов данного исследования.

- ***Определение восстановления нитросинего тетразолия фагоцитирующими клетками спектрофотометрически (НСТ-тест).*** Тест отражает суммарную продукцию активных форм кислорода нейтрофилами. В основе метода лежит способность восстановления поглощенного фагоцитом красителя нитросинего тетразолия в нерастворимый диформазан под влиянием активных форм кислорода. Измерения проводили в цельной крови. В

плоскодонные планшеты вносили 50 мкл. цельной крови и 20 мкл. раствора НСТ на лунку и инкубировали 60 мин. при 37°C с 20 мкл. *st.aureus* для определения индуцированной продукции кислородных радикалов или 20 мкл. PBS, для определения спонтанной продукции. После клетки троекратно отмывали и фиксировали 96% этиловым спиртом, 100мкл на луку, в течение 30 мин. остатки спирта удаляли декантированием, планшет высушивали. Растворяли осадок в 250 мкл. ДМСО. Оптическую плотность измеряли при $\lambda=450\text{nm}$.

Индекс стимуляции рассчитывали как отношение индуцированной активности к спонтанной. Для индукции использовали культуру *st. aureus* (в концентрации 1 млн./мл, убитых автоклавированием) (Модификация метода Р.М.Хайтов. 1995г.).

• **Определение активности Миелопероксидазы (МПО) спектрофотометрически.** Тест позволяет судить о кислородзависимой бактерицидной активности фагоцитов, изменение активности миелопероксидазы при стимуляции клеток косвенно свидетельствует о способности клеток к дегрануляции и возможностям компенсировать потери фермента за счет его внутриклеточного новообразования. Измерения проводили в цельной крови. В плоскодонные планшеты вносили 50 мкл цельной крови на лунку и инкубировали 60 мин. при 37°C с 20 мкл. *st.aureus* для определения индуцированной продукции миелопероксидазы или 20 мкл. PBS, для определения спонтанной активности. После клетки троекратно отмывали, в лунку вносили 100 мкл. субстратной смеси, состоящей из 0,04% ортофенилендиамина и 0,014 H₂O₂ на фосфатноцитратном буфере. Реакция останавливалась добавлением 100мкл 10% H₂SO₄. Интенсивность оптической плотности фиксировали в многоканальном спектрофотометре. При длине волны $\lambda=492\text{nm}$. Индекс стимуляции рассчитывается как отношение индуцированной активности к спонтанной. Для индукции использовали культуру *st. aureus* (в концентрации 1 млн./мл, убитых автоклавированием). (Модификация методов Р.М.Хайтов. 1995г.).

• **Определение количества неферментативных катионных белков (КБ) спектрофотометрически.** КБ характеризуют кислороднезависимую бактерицидную систему нейтрофилов, способность к внутриклеточному и экстрацеллюлярному Киллингу. Измерения проводили в цельной крови. Для определения количества катионных белков использовали 96-луночные

плоскодонные планшеты. 50 мкл. цельной крови инкубировали 60 мин. при 37°C с 20 мкл. *st. aureus* для определения индуцированной продукции катионных белков или 20 мкл. ФБС для определения спонтанной активности. После клетки троекратно отмывали и фиксировали 96% этиловым спиртом, 100мкл на луку, 30 мин. остатки спирта удаляли декантированием, планшет высушивали. Клетки окрашивали зеленым прочным - 100мкл на лунку 30 мин t 37⁰С. Краску удаляли, клетки троекратно отмывали PBS. Далее растворяли в 200 мкл. ДМСО. Оптическую плотность измеряли при $\lambda=540$ нм.

Для индукции использовали культуру *st. aureus* (в концентрации 1 млн./мл, убитых автоклавированием). (Модификация метода Р.М.Хаитов 1995г.).

- **Определение фагоцитарной активности нейтрофилов.** Для изучения поглощения использовали культуру *st. aureus* (в концентрации 1 млн./мл, убитых автоклавированием), подсчет фагоцитирующих клеток и поглощенных частиц осуществлялся с помощью светового микроскопа.
- **Пробы с циклофероном** *in vitro*, проводили с часовой инкубацией цельной крови с препаратом, в концентрации 0,05мг/мл.

Результаты исследования и их обсуждение

Состояние функциональной активности НФ у больных с тяжелым течением инфекции, вызванной вирусами простого герпеса 1 и 2 типа.

Обследованные больные были разделены на группы в зависимости от исходного значения спонт. НСТ-теста (низкие, нормальные и высокие). Результаты представлены в таблице 2.

У 31 чел. (47,7%) больных с тяжелым ГИ ВПГ1,2, показатели спонтанного НСТ-теста были выше нормы и составили в среднем 144.0 ± 4.85 усл.ед., что достоверно ($p \leq 0,01$) отличается от группы контроля - $88,22 \pm 5,23$ усл.ед. Оказалось что, в группе с высокими показателями спонт. НСТ-теста у 25 человек (80,6%) больных Индекс Стимуляции (ИС) был значительно ниже нормы.

Таблица 2.

Средние значения НСТ-теста и ИС у больных с тяжелым течением инфекции, вызванной вирусами простого герпеса 1 и 2 типа с различным уровнем спонтанного НСТ теста (n=65) и в контрольной группе.

Подгруппы	Количество человек	Спонт. НСТ Усл.ед.	Стим. НСТ Усл.ед	ИС НСТ
Контрольная группа	60 чел	88,22±5,23	146,37±9,50	1,65±0,15
Б-е с уровнем спонт. НСТ менее 70 усл.ед	21чел (32,3%)	48,00±3,31**	47,53±5,70**	0,99±0,10*
Б-е с уровнем спонт. НСТ 70-110 усл.ед	13 чел (20%)	93,30±4,20	91,56±5,60*	0,98±0,10*
Б-е с уровнем спонт. НСТ более 110 усл.ед.	31 чел (47,7%)	144,00±4,85**	137,00±10,30	0,95±0,05*

* $p \leq 0,05$, достоверность отличий от показателя контрольной группы

** $p \leq 0,01$, достоверность отличий от показателя контрольной группы

Нормальные показатели спонт НСТ-теста выявлены у 13 (20%) больных с тяжелым течением инфекции вызванной ВПГ1,2 типа, в среднем составил 93,3±4,2 усл.ед., индуцированный - 91,56±5,6 усл.ед, ИС – 0,98±0,10, что говорит о наличии гипореактивности нейтрофилов к синтезу активных форм кислорода (АФК) в ответ на стимуляцию *Staph. aureus*.

Сниженные показатели спонтанного НСТ-теста (в среднем - 48,0±3,3 усл.ед.) наблюдались у 21чел. (32,3%), индекс стимуляции у них составил 0,99±0,10, а индуцированный показатель - 47,53±5,7 усл.ед.. В группе с низкими показателями НСТ-теста у 15 чел (71,4%) выявлен низкий ответ на стимуляцию *Staph. aureus*. Это может свидетельствовать о выраженном снижении способности к синтезу АФК у больных этой группы.

Среди обследованных пациентов (n=65) низкий ИС в НСТ-тесте был выявлен у 47 больных (72,3%) и в среднем составил 0,67±0,03. Это означает, что у больных ГИ ВПГ1,2-типа, тяжелого течения в ответ на стимуляцию *Staph. aureus* продукция АФК не возрастает, а существенно угнетается. У 27,7% - 18 человек

выявлен адекватный ответ НФ на стимуляцию (ИС у них в среднем был $1,64 \pm 0,05$ при показателе в группе контроля $-1,65 \pm 0,15$).

- Таким образом, у больных с тяжелым течением инфекции, вызванной вирусами простого герпеса 1 и 2 типа, количество АФК снижено в 32,3% случаев или находится в пределах нормы практически здоровых людей у 20% больных, несмотря на наличие активной вирусной инфекции. Низкий индекс стимуляции выявлен у 72,3%, что свидетельствует о гипореактивности и снижении кислородзависимой бактерицидной функции нейтрофилов.

При исследовании миелопероксидазной системы были получены следующие данные (таблица 3). Среднее значение спонт. МПО у обследованных больных составляло $554,53 \pm 23,26$ усл.ед. Больные были разделены на группы по уровню спонт. активности МПО (низкий, нормальный, высокий уровень).

Таблица 3.

Средние значения стимулированной активности миелопероксидазы и ИС МПО у больных с герпетической инфекцией, вызванной ВПГ1,2-типа тяжелого течения с различной спонтанной активностью МПО (n=65).

	Кол-во человек	Спонт. МПО Усл.ед.	Стим. МПО Усл.ед	ИС МПО
Контрольная группа	60 чел	$509,2 \pm 12,40$	$843,06 \pm 24,85$	$1,66 \pm 0,08$
Б-е с уровнем активности спонт. МПО до 500 усл.ед.	32чел 49,3%	$322,17 \pm 14,80$ **	$508,67 \pm 9,25$ **	$1,58 \pm 0,16$
Б-е с уровнем активности спонт. МПО 500-700 усл.ед.	19чел 29,2%	$583,63 \pm 14,41$ *	$833,25 \pm 40,05$	$1,43 \pm 0,08$
Б-е с уровнем активности спонт. МПО более 700 усл. ед.	14чел 21,5%	$969,17 \pm 18,9$ **	$755,75 \pm 49,56$	$0,78 \pm 0,08$ **

* $p \leq 0,05$, достоверность отличий от показателя контрольной группы

** $p \leq 0,01$, достоверность отличий от показателя контрольной группы

У больных с тяжелым течением инфекции, вызванной вирусами простого герпеса 1 и 2 типа у 46 человек (70,7%), были выявлены достоверные отличия от показателя спонт. МПО группы здоровых лиц. Так, у 32 чел (49,3%) определялось резкое снижение активности спонт. МПО (в среднем $322,17 \pm 14,80$ усл.ед, при показателе группы здоровых лиц $509,2 \pm 12,40$ усл.ед, $p < 0,01$), а у 14 чел (21,5%) – существенное повышение активности спонт. МПО (среднее значение $969,17 \pm 18,90$ усл.ед, $p < 0,01$). У 19 больных (29,2%) значение активности спонт. МПО находилось в пределах нормы (500-700 усл.ед). В норме активность МПО после индукции *Staph.aureus* повышается по отношению к исходному уровню в 1,3-1,8 раза. Однако, как показали полученные нами данные, у 14 больных (21,5%), с тяжелым течением инфекции, вызванной вирусами простого герпеса 1 и 2 типа, стимуляция НФ стафилококками приводила не к повышению, а существенному снижению активности МПО, что отражалось в крайне низком ИС МПО (в среднем $0,59 \pm 0,02$, при показателе контрольной группы $1,66 \pm 0,08$, $p < 0,01$). У 22 больных (33,8%) ИС МПО находился в пределах от 0,9 до 1,2 (среднее значение $1,08 \pm 0,02$), что свидетельствует о слабом ответе НФ на дополнительные стимулы (явление гипореактивности). Более чем у половины больных (56,9% - 37 чел) было выявлено снижение стимулированной активности МПО. У 18 из 65 больных (27,7%) ИС МПО находился в пределах нормы и составил в среднем $1,51 \pm 0,03$, у 10 чел. (15,4%) был повышен до $2,90 \pm 0,21$, $p < 0,01$.

- Таким образом, у больных с тяжелым течением инфекции, вызванной вирусами простого герпеса 1 и 2 типа, наблюдается гипореактивность миелопероксидазной системы: снижение в 49,3% случаев и показатели соответствующие норме у 29,2% больных. Не смотря на наличие активной герпетической инфекции лишь у 21,5% больных повышенная активность МПО. Причем у больных с высокой активностью МПО ИС как правило меньше 1,0.

Состояние кислороднезависимой бактерицидности у больных с тяжелым течением инфекции, вызванной ВПГ 1 и 2 типа исследовали по уровню катионных белков (КБ). При анализе данных (таблица 4) больные были разделены на группы в зависимости от спонтанного уровня КБ (низкий, нормальный и высокий).

Таблица 4.

Показатели Катионных Белков у больных с инфекцией, вызванной вирусами простого герпеса 1 и 2 типа, тяжелого течения. n=65

Группа	КБ спонт. Усл.ед.	КБ индуцир. Усл.ед.	Индекс Стимуляции
Контрольная группа (n=60)	85,5±2,3	90,25±4,81	1,2±0,05
Больные с уровнем КБ до 75 усл.ед (n=33 50,8%)	51,58±2,62*	39,17±2,78* ,**	0,76±0,06*
Больные с уровнем КБ 75-98 усл.ед (n=20 30,7 %)	81,64±1,15	61,64±4,7* ,**	0,75±0,06*
Больные с уровнем КБ более 98 усл. ед (n=12 18,5%)	115,0±3,5*	83,0±4,4**	0,72±0,04*

* - достоверность отличий от показателей контроля, $p \leq 0,05$.

** - достоверность отличий от спонтанного показателя КБ, $p \leq 0,01$

Выявлено, что 33 чел. – 50,8% обследованных больных имеют низкий уровень КБ ($51,58 \pm 2,62$ усл.ед), что свидетельствует о снижении кислороднезависимой бактерицидности. ИС в этой группе низкий и составляет $0,75 \pm 0,06$.

Среди обследованных с тяжелым течением инфекции, вызванной вирусами простого герпеса 1 и 2 типа 30,7% - 20 больных с неизменным уровнем КБ ($81,64 \pm 1,15$ усл.ед.), у которых так же отсутствуют резервные возможности увеличения КБ (ИС в среднем $0,75 \pm 0,06$).

У 12 чел. (18,5%) выявлено повышение КБ ($115,0 \pm 3,5$ усл.ед). Индекс стимуляции в этой группе также низкий ($0,72 \pm 0,04$), что свидетельствует об истощении резервных механизмов.

При оценке Индекса Стимуляции у 50 чел (76,9%) обследованных больных наблюдалось резкое снижение КБ в ответ на стимуляцию бактериальными агентами. У 15,4% (10чел) обследованных ИС КБ находился в пределах от 0,9 до 1,1 (среднее значение $0,96 \pm 0,02$) что свидетельствует об отсутствии адекватного ответа НФ на стимуляцию бактериальными агентами (явление гипореактивности).

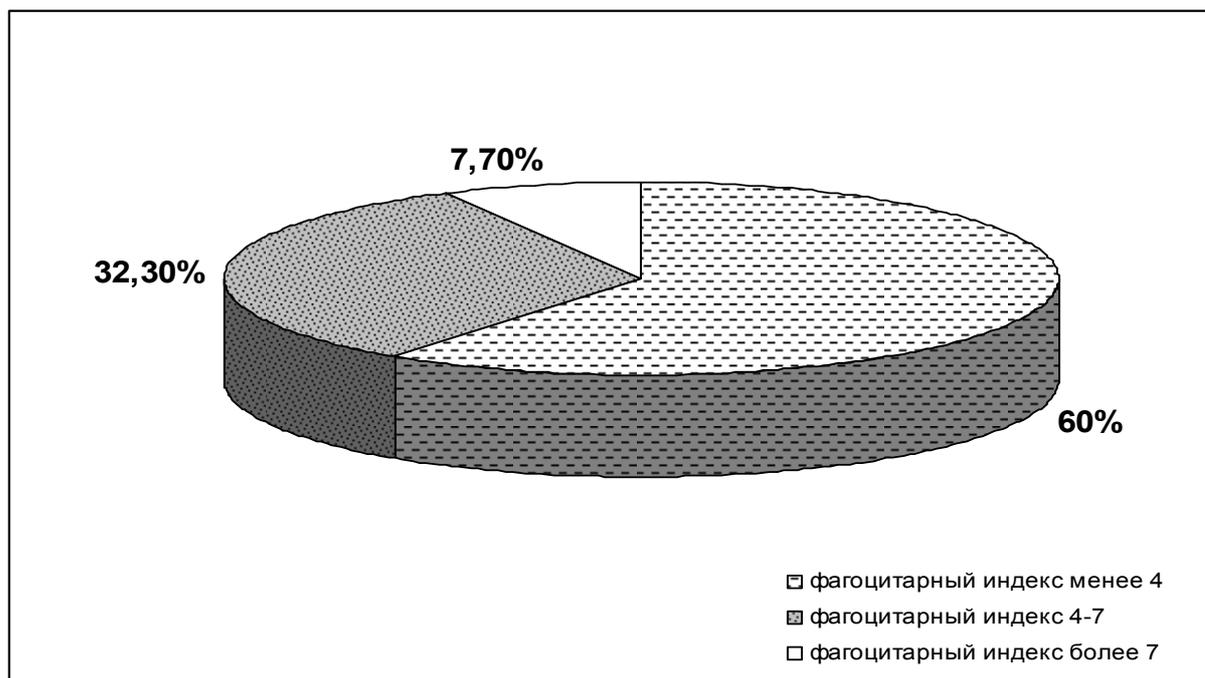
Т.е. 92,3% (60 чел) больных с тяжелым течением инфекции, вызванной ВПГ1,2 типа имеет низкие показатели ИС КБ ($p \leq 0,01$).

- Таким образом, снижение уровня катионных белков наблюдается у 50,8% больных с тяжелым течением инфекции, вызванной вирусами простого герпеса 1 и 2 типа. Причем, низкий и гипореактивный ИС выявлен у 92,3% обследованных, что свидетельствует об истощении кислороднезависимых бактерицидных механизмов НФ.

Для оценки фагоцитарной функции НФ определяли фагоцитарное число и фагоцитарный индекс на 30 и 60 минуте.

Рисунок 1.

Среднее количество микробоцидных тел поглощенных нейтрофилом у больных с тяжелым течением инфекции, вызванной вирусами простого герпеса 1 и 2 типа к 30 минуте инкубации (n=65).



При рассмотрении ФИ 30' получили следующее распределение поглотительной способности НФ у больных ВПГ1,2-инфекцией тяжелого течения (рисунок 1, таблица 5).

У 60% - 39 больных НФ поглощают менее 4 микробоцидных частиц, в среднем $2,87 \pm 0,09$, что значительно ниже нормы, $p < 0,01$. 32,3% - 21 больной ВПГ1,2 инфекцией тяжелого течения имеют ФИ 30' равный $5,22 \pm 0,17$. И 7,7% - 5 больных имеют ФИ 30' $7,37 \pm 0,19$, что незначительно превышает верхнюю границу нормы $p < 0,01$.

Переваривающую способность НФ оценивали на 60 минуте. Фагоцитарное число у большинства больных к 60 минуте достоверно возросло (в среднем по группе с $43,87 \pm 1,96\%$ до $50,96 \pm 1,83\%$; $p \leq 0,05$).

При рассмотрении ФИ мы разделили больных в зависимости от величины ФИ на 30 минуте (менее 4, 4-7, более 7) таблица 5.

Таблица 5.

Распределение показателей фагоцитарной функции нейтрофилов у больных с тяжелым течением инфекции, вызванной вирусами простого герпеса 1 и 2 типа в зависимости от количества поглощенных микробоцидных тел к 30 минуте (n=65).

	Чел/%	ФЧ 30' %	ФИ 30' ед/нф	ФЧ 60' %	ФИ 60' ед/нф	ИЗ
Контрольная группа n=60	n=60	$74,26 \pm 1,4$	$5,62 \pm 0,22$	$37,5 \pm 0,87$	$2,35 \pm 0,06$	$2,4 \pm 0,09$
ФИ 30' менее 4	n=38 58,5%	$35,78 \pm 1,96$ **	$2,87 \pm 0,09$ **	$45,96 \pm 2,01$ *,**	$3,4 \pm 0,14$ *,**	$0,89 \pm 0,04$ **
ФИ 30' 4-7	n=22 33,8%	$54,38 \pm 3,22$ **	$5,22 \pm 0,17$	$54,94 \pm 2,63$ **	$4,16 \pm 0,21$ *,**	$1,33 \pm 0,06$ **
ФИ 30' более 7	n=5 7,7%	$56,5 \pm 2,24$ **	$7,37 \pm 0,19$ **	$67,05 \pm 3,92$ **	$6,28 \pm 0,14$ *,**	$1,19 \pm 0,05$ **

* - достоверность отличий от показателя на 30 минуте в этой подгруппе $p < 0,05$

** - достоверность отличий от показателей контрольной группы, $p \leq 0,01$.

Во всех группах наблюдается достоверное ($p < 0,05$) изменение ФИ к 60 минуте. Так же во всех группах наблюдалось снижение переваривающей функции нейтрофилов ИЗ достоверно отличался от ИЗ группы контроля ($p \leq 0,01$).

Индекс Завершенности фагоцитоза рассчитывали как ФИ 30'/ФИ 60'. В норме он более 2. Несмотря на наличие переваривающей способности НФ у 33,8%

(22 чел) больных с тяжелым течением инфекции, вызванной вирусами простого герпеса 1 и 2 типа, завершено фагоцитоза практически не происходит.

- Таким образом, у больных с тяжелым течением инфекции, вызванной вирусами простого герпеса 1 и 2 типа, наблюдается снижение фагоцитарной функции нейтрофилов, как поглотительной (у 58,5% обследованных), так и переваривающей (снижение индекса завершенности фагоцитоза у большинства больных).

Действие препарата циклоферон на показатели функциональной активности НФ.

В последние годы серьезной проблемой для практического здравоохранения стало увеличение рецидивирующих тяжелых форм инфекции, вызванной вирусами простого герпеса 1 и 2 типа, и появление резистентности к специфической терапии аномальными нуклеотидами.

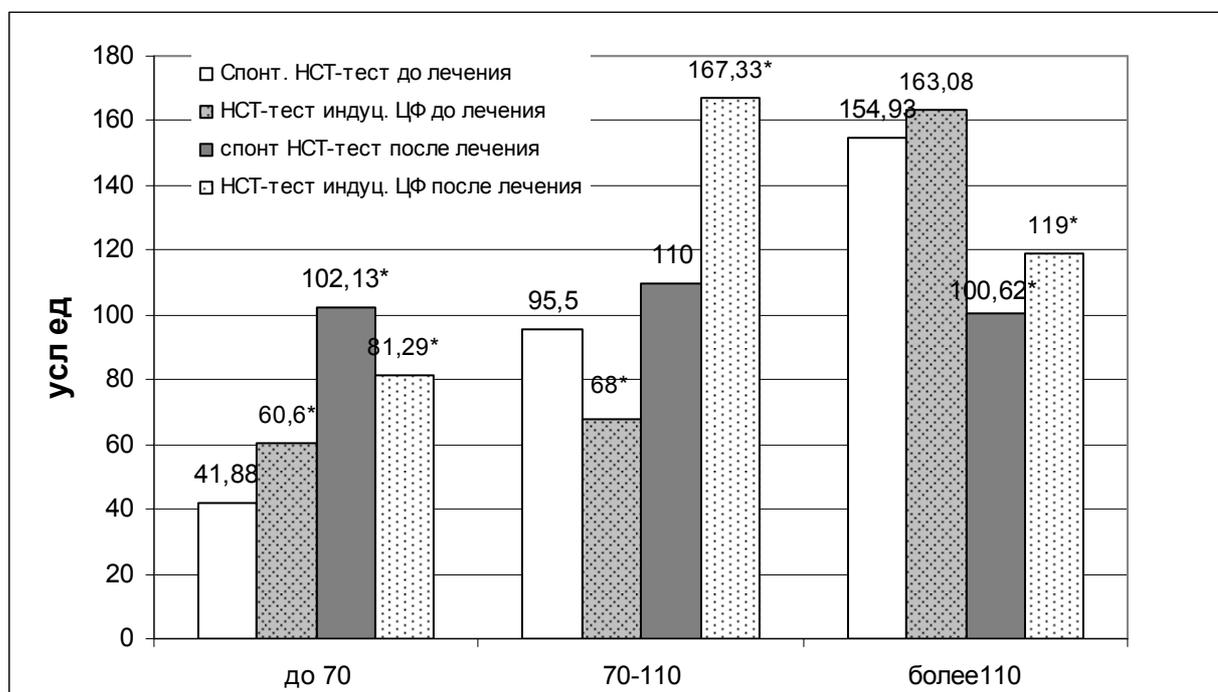
Препарат циклоферон - низкомолекулярный индуктор выработки эндогенных интерферонов. НФ и макрофаги являются одними из клеток мишеней для данного препарата. Препарат рекомендован Росздравом для терапии инфекции, вызванной вирусами простого герпеса 1 и 2 типа.

Мы провели исследование влияния терапии циклофероном (циклоферон принимали в таблетированной форме в дозе 5 мг/кг один раз в 3 дня, всего 10 приемов) на показатели бактерицидности НФ у больных с тяжелым течением инфекции, вызванной ВПГ-1,2 типа. Результаты НСТ-теста полученные при обследовании больных с инфекцией, вызванной вирусами простого герпеса 1 и 2 типа тяжелого течения представлены на рисунке 2.

В группе с исходно низкими значениями спонт. НСТ-теста (14 чел, 38,9%), в тесте *in vitro* циклоферон оказывал достоверное стимулирующее действие $p < 0,05$ (с $41,88 \pm 6,5$ усл.ед. до $60,6 \pm 12,45$ усл.ед.), после проведения курса терапии циклофероном показатель так же достоверно увеличивался ($102,13 \pm 9,2$ усл.ед) $p < 0,01$. В повторной пробе с циклофероном после курса лечения продукция АФК была в 2 раза выше исходных показателей ($81,29 \pm 5,84$ усл.ед).

Рисунок 2.

Показатели НСТ-теста спонтанного и индуцированного циклофероном до и после терапии циклофероном у больных с тяжелым течением инфекции, вызванной вирусами простого герпеса 1 и 2 типа. (n=36)



*- достоверность отличий показателей до и после терапии от спонт НСТ-теста до лечения, $p \leq 0,05$.

В группе с нормальными исходными значениями НСТ-теста (6 чел, 16,7%) эти значения в пробе *in vitro* до лечения и курса терапии циклофероном оставались в пределах нормы (соответственно $68,0 \pm 3,64$ усл.ед ; $110,0 \pm 13,26$ усл. ед.; $p < 0,01$) см. рис.2. Проба с циклофероном *in vitro* после лечения давала достоверный рост показателя ($167,33 \pm 11,2$ усл.ед). Это свидетельствует о возможности гиперактивации синтеза АФК при продолжении данной терапии.

В группе с исходно высокими показателями НСТ-теста (16 чел., 44,4%) под влиянием препарата *in vitro* наблюдалось незначительное снижение показателя ($134,14 \pm 7,48$ усл.ед), а после курса терапии спонт. НСТ достоверно снизился и находился в пределах нормы ($100,62 \pm 6,18$ усл.ед). Повторная проба с циклофероном показала некоторое повышение АФК ($119,0 \pm 10,25$ усл.ед).

- Таким образом, лечение циклофероном у больных с тяжелым течением инфекции, вызванной вирусами простого герпеса 1 и 2 типа приводит к нормализации показателей НСТ-теста и практически не влияет на исходно нормальные его значения. У большинства больных после терапии сохраняется ответ на стимуляцию циклофероном в тесте *in vitro*.

Влияние курса терапии циклофероном на активность миелопероксидазы у больных с тяжелым течением инфекции, вызванной ВПГ 1 и 2 типа, представлено на рисунке 3.

В группе с исходно низким показателем МПО ($n=17$; $295,0 \pm 16,9$ усл.ед.) циклоферон достоверно увеличивает активность МПО *in vitro* ($383,4 \pm 15,98$ усл.ед $p < 0,05$), после проведения терапии показатель становится достоверно выше исхода ($661,15 \pm 50,36$ усл.ед). Проба с циклофероном после курса терапии, снижает уровень МПО ($440,22 \pm 26,27$ усл.ед), что может свидетельствовать о неадекватном ответе НФ при продолжении терапии.

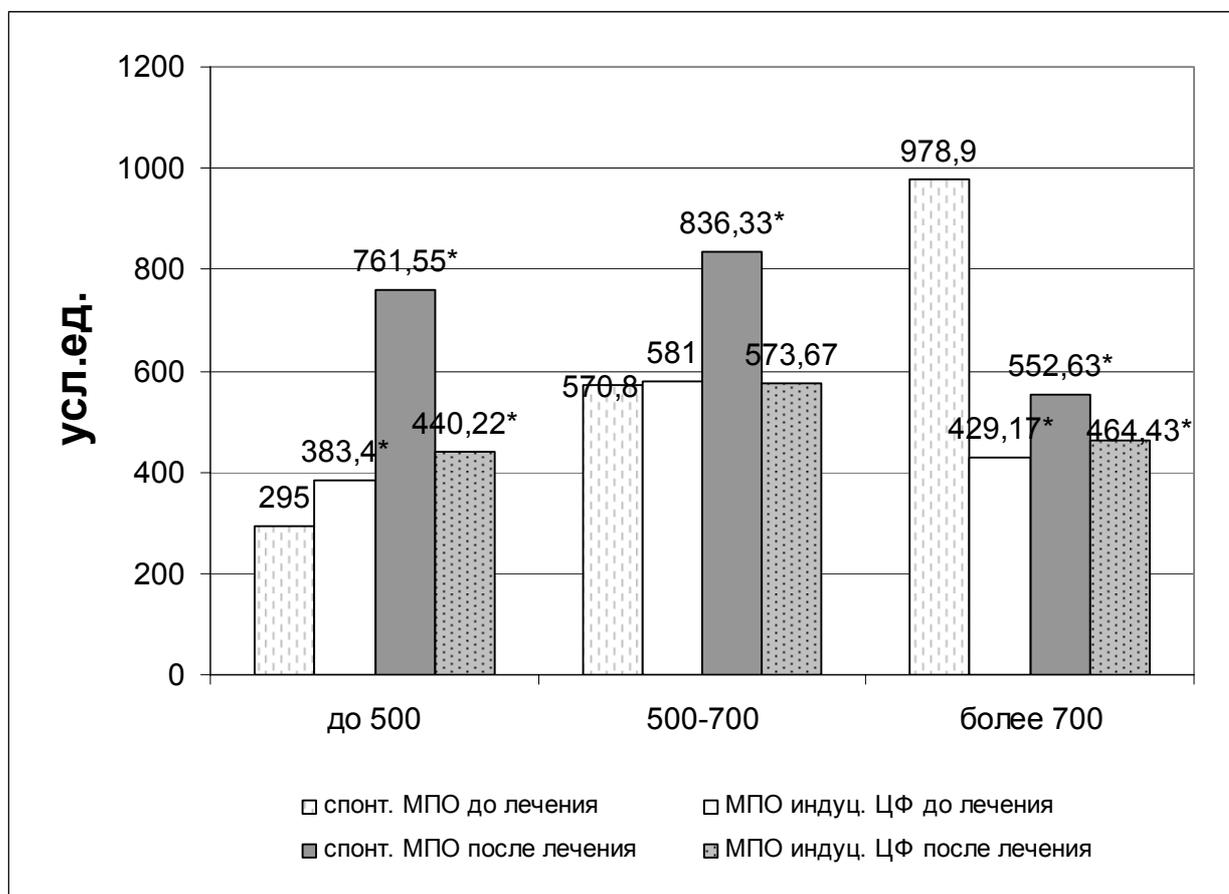
В группе с показателем МПО в пределах нормы ($n=10$; $570,83 \pm 46,49$ усл.ед) в тесте *in vitro* циклоферон не оказывал достоверного влияния ($581,11 \pm 56,46$ усл.ед). После курса терапии уровень спонт МПО достоверно увеличился (в среднем до $836,33 \pm 78,48$ усл.ед.), а реакция на циклоферон в тесте *in vitro* достоверно не отличалась от таковой до лечения ($573,67 \pm 48,43$ усл.ед).

В группе с высокими значениями активности МПО ($n=9$; $978,88 \pm 58,17$ усл.ед) в пробе с циклофероном *in vitro* получено достоверное снижение показателя ($429,17 \pm 23,87$ усл.ед) и после терапии показатель так же достоверно снижался $p < 0,01$, по сравнению с исходом ($552,63 \pm 49,07$ усл.ед). Проба с циклофероном после терапии оставалась в пределах нормы.

Корреляционный анализ выявил достоверную корреляцию активности МПО в пробе *in vitro* с циклофероном до лечения с показателем спонт.МПО после курса терапии циклофероном ($r=0,76$).

Рисунок 3.

Показатели активности МПО спонтанной и индуцированной циклофероном у больных с тяжелым течением инфекции, вызванной вирусами простого герпеса 1 и 2 типа, до и после терапии циклофероном (n=36).



*-достоверность отличий показателей МПО до и после терапии от спонт. МПО до лечения, $p \leq 0,05$.

- Таким образом, определение активности МПО *in vitro* при инкубации с циклофероном, может быть использовано в качестве прогностического критерия влияния курсового лечения циклофероном на активность этого фермента.

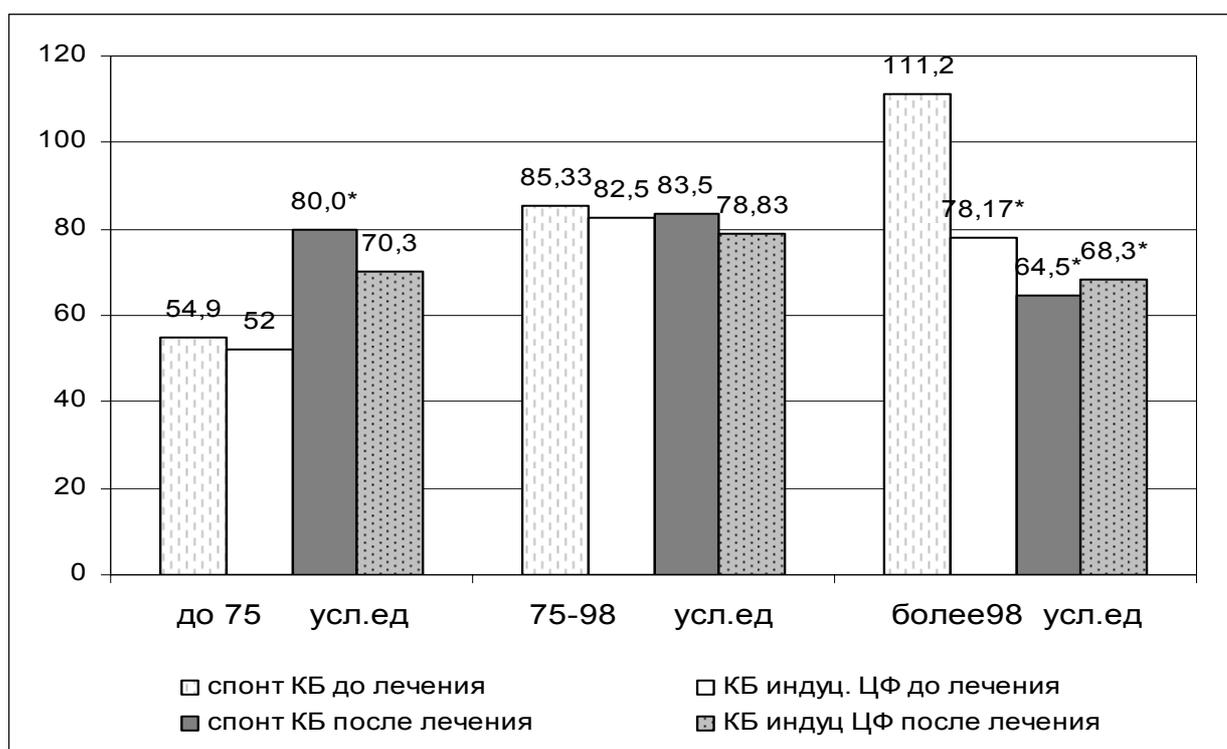
При исследовании уровня КБ у больных с тяжелым течением инфекции, вызванной вирусами простого герпеса 1 и 2 типа, после курса терапии циклофероном получены следующие данные (рисунок 4).

В группе с исходно низкими катионными белками (n=18 человек -50% $54,91 \pm 3,18$ усл.ед) достоверного ответа на препарат в пробе *in vitro* до лечения не

выявлено ($52,0 \pm 7,74$ усл.ед), однако после курса терапии циклофероном наблюдается достоверный рост показателя ($80,00 \pm 3,76$ усл.ед).

Рисунок 4.

Влияние терапии циклофероном на показатель катионных белков, у больных с тяжелым течением инфекции, вызванной вирусами простого герпеса 1 и 2 типа, с исходно низкими, нормальными и высокими значениями КБ. n=36.



*-достоверность отличий показателей до и после лечения от спонт КБ до лечения, $p \leq 0,05$.

Группа больных с тяжелым течением инфекции, вызванной ВПГ1,2 типа, с нормальными показателями КБ (n=11 человек – 30,5%; $85,33 \pm 3,89$ усл.ед), не давала достоверных изменений как на пробу с препаратом *in vitro* ($82,5 \pm 6,18$ усл.ед), так и на курс лечения циклофероном ($83,5 \pm 11,84$ усл.ед).

В группе с высоким исходным значением КБ (n= 7 чел- 19,5% ; $111,17 \pm 3,89$ усл.ед) в пробе *in vitro* до лечения нет достоверных изменений ($78,17 \pm 8,3$ усл.ед). После курса терапии циклофероном наблюдается достоверное снижение показателя КБ ($64,5 \pm 8,84$ усл.ед).

После лечения циклофероном индекс стимуляции КБ достоверно возрастает в группах с низкими и высокими значениями исходных показателей КБ.

- Таким образом, терапия циклофероном оказывает модулирующее, нормализующие действие на уровень КБ у больных с тяжелым течением инфекции, вызванной вирусами простого герпеса 1 и 2 типа.

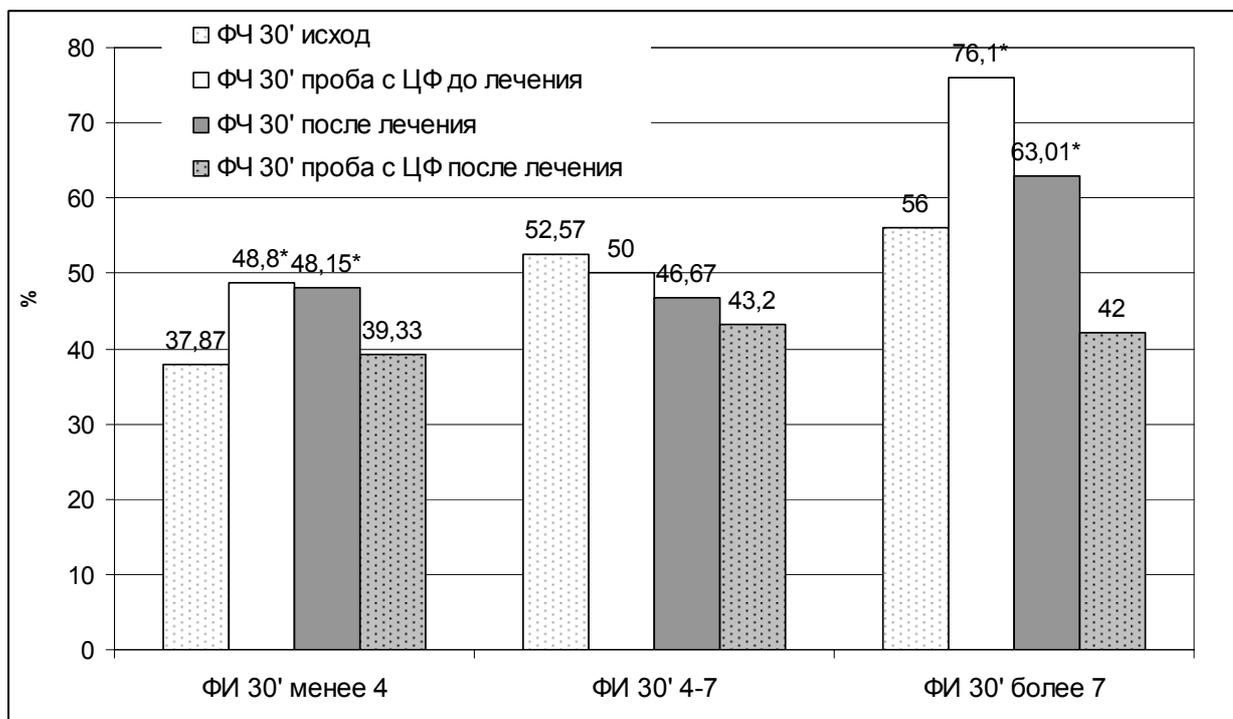
При оценке фагоцитарной функции НФ у больных с тяжелым течением инфекции, вызванной ВПГ1,2-типа, после курса терапии циклофероном были получены следующие результаты (см. рисунок 5).

Фагоцитарное число, характеризующее количество активных фагоцитирующих нейтрофилов, в группе с исходно нормальными значениями фагоцитарного индекса после терапии ЦФ достоверно не изменяется ($52,57 \pm 3,02\%$).

В группе с исходно низкими значениями Фагоцитарного Числа (ФЧ) ($37,87 \pm 2,77\%$) ФЧ достоверно растет, как в тесте *in vitro* ($48,8 \pm 1,85\%$), так и после курса лечения ($48,15 \pm 2,15\%$).

Рисунок 5.

Изменение фагоцитарного числа у больных с тяжелым течением инфекции, вызванной вирусами простого герпеса 1и2 типа, после курса циклоферона, в зависимости от исходного уровня Фагоцитарного Индекса.



*- достоверность отличий показателей до и после лечения от исходного ФИ 30', $p < 0,05$

Как видно из рисунка 5, в группе с исходно высоким показателем ФИ ФЧ ($56,0 \pm 0,01\%$) на стимуляцию препаратом *in vitro* наблюдается достоверный рост показателя ($76,1 \pm 0,03\%$), после лечения показатель также достоверно растет, по сравнению с исходом ($63,01 \pm 2,51\%$), и по сравнению с контрольной группой.

В группе с исходно низким ФИ показатели фагоцитарного индекса достоверно растут, как в тесте *in vitro* так и после приема препарата. Исходно высокий показатель ФИ под действием циклоферона снижается *in vitro* и также достоверно падает после курса терапии препаратом. В контрольной группе ФИ достоверно уменьшается, а ИЗ равен $2,4 \pm 0,09$.

- Таким образом, курсовой прием циклоферона достоверно увеличивает Фагоцитарное Число на 30 минуте, у больных тяжелым течением инфекции, вызванной вирусами простого герпеса 1 и 2 типа, приближая его к нормальным показателям.

Выводы

1. У большинства больных с инфекцией, вызванной вирусами простого герпеса 1 и 2 типа тяжелого течения, нарушен синтез активных форм кислорода - в 52,3% случаев выявлена гипореактивность этой системы (нормальный или сниженный уровень НСТ-теста несмотря на наличие активной вирусной инфекции). У 72,3% больных (47 чел.) выявлено снижение индекса стимуляции НСТ-теста, что свидетельствует о снижении резервной способности кислородзависимой бактерицидности нейтрофилов. У 47,7% (31чел) больных наблюдалось чрезмерное повышение образования активных форм кислорода, что свидетельствует о недостаточности у них антиоксидантной системы.
2. У большинства больных -78,5% (51чел) с инфекцией, вызванной вирусами простого герпеса 1 и 2 типа тяжелого течения, выявлена гипореактивность миелопероксидазной системы (нормальная или сниженная активность миелопероксидазы, несмотря на наличие активной вирусной инфекции). Только у 21,5% (14 чел) больных

активность миелопероксидазы повышена. Более чем у половины больных - 56,9% (37чел) было выявлено снижение стимулированной активности миелопероксидазы.

3. У больных с инфекцией, вызванной вирусами простого герпеса 1 и 2 типа тяжелого течения в большинстве случаев (81,5%) выявлено нарушение в системе кислороднезависимой бактерицидности нейтрофилов: у 50,8% (33чел) обнаружено снижение уровня спонтанных катионных белков, у 92,3% (60 чел) снижение индекса стимуляции, что свидетельствует о выраженной супрессии этой системы.
4. У большинства больных с тяжелым течением инфекции, вызванной вирусами простого герпеса 1 и 2 типа наблюдаются нарушения фагоцитарной функции нейтрофилов: снижено количество фагоцитирующих нейтрофилов (фагоцитарное число) у 96,9% (63чел), количество поглощенных микробоцидных тел (фагоцитарный индекс) у 58% (39чел), и переваривающая способность нарушена у 33,8% (22 чел) обследованных больных;
5. В большинстве случаев циклоферон оказывает модулирующее действие на показатели функциональной активности нейтрофилов у больных с тяжелым течением инфекции, вызванной вирусами простого герпеса 1 и 2 типа, в тестах *in vivo* и *in vitro* и в большей степени циклоферон влияет на кислородзависимую бактерицидность нейтрофилов.

Практические рекомендации

1. У больных с инфекцией, вызванной вирусами простого герпеса 1 и 2 типа, Тяжелого течения, для достоверной оценки ответа иммунной системы на инфекционный процесс и назначения адекватной терапии, а так же контроля за ее эффективностью, кроме исследования клеточного и гуморального звеньев иммунитета необходимо проведение исследования функциональной

активности нейтрофилов с тестом *in vitro* с циклофероном до начала курса лечения.

2. При выявлении дисфункции нейтрофилов с целью коррекции этих нарушений может быть рекомендован курс терапии циклофероном.

Работы опубликованные по теме диссертации.

1. Дидковский Н.А., Малашенкова И.К., Танасова А.Н., Зуйков И. А., Зуйкова И.Н, Хитрик Н.М., Сарсания Ж.Ш.. «Патогенетические аспекты герпетической инфекции тяжелого течения» Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2007, прил. 2, с.76-81.
2. Дидковский Н.А., Малашенкова И.К., Танасова А.Н., Зуйкова И.Н. Зуйков И.А., Хитрик Н.М., Сарсания Ж.Ш. Актуальные вопросы тяжелой герпетической инфекции у взрослых.// Лечащий врач 2006. №2. – С.4-11.
3. Малашенкова И.К., Дидковский Н.А., Хитрик Н.М. Индивидуальный подбор иммунокорректоров методом хемилюминесценции.// Тезисы II Всемирного конгресса по иммунопатологии и аллергии. Москва, Россия, 14-17 мая 2004. Аллергология и иммунология т.5, №1 , 2004, стр.43.
4. Дидковский Н.А. Малашенкова И.К., Азизова О.А., Ледов А.В., Левко А.А., Хитрик Н.М., Сарсания Ж.Ш., Танасова А.Н., Чистова Л.А. Тезисы II всемирного конгресса по иммунопатологии и аллергологии. Москва, Россия 14-17 мая 2004г. Аллергология и иммунология т.5.№1, 2004, стр. 128.
5. Малашенкова И.К. Хитрик Н.М., Паджев А.М., Нарушение показателей кислородзависимой бактерицидности у больных ВПГ. Материалы II международной научной конференции «Современные аспекты реабилитации в медицине» Ереван 2005 с.222.
6. Хитрик Н.М., Малашенкова И.К. Состояние фагоцитарной функции нейтрофилов у больных вирусом простого герпеса. Материалы II международной научной конференции «Современные аспекты реабилитации в медицине» Ереван 2005. С375.
7. Малашенкова И.К. Хитрик Н.М. Танасова А.Н., Паджев А.М., Дидковский Н.А. Нарушение показателей кислородзависимой бактерицидности у больных ВПГ.

Материалы II международной научной конференции «Современные аспекты реабилитации в медицине» Ереван 2005. С-140.

8. Хитрик Н.М., Малашенкова И.К., Танасова А.Н., Дидковский Н.А., Состояние фагоцитарной функции нейтрофилов у больных вирусом простого герпеса. Материалы II международной научной конференции «Современные аспекты реабилитации в медицине» Ереван 2005. С-240.

9. Зуйков И.А., Танасова А.Н., Жарова М.А., Хитрик Н.М., Малашенкова И.К., Дидковский Н.А. Уровень провоспалительных цитокинов у больных с тяжелым течением герпетической инфекции// Аллергология и иммунология. – 2006. Том7.- №3. – С.396.

10. Танасова А.Н., Дидковский Н.А., Малашенкова И.К., Зуйков И.А., Хитрик Н.М., Малиновская В.А. Интерферонотерапия хронической герпетической инфекции тяжелого течения.// Аллергология и иммунология. -2006г. Том7. -№3. – С396.

11. Хитрик Н.М., Малашенкова И.К., Танасова А.Н., Зуйков И.А., Дидковский Н.А., Малиновская В.А. Влияние интерферона-альфа и его индуктора на функциональную активность нейтрофилов при тяжелой герпетической инфекции.// Аллергология и иммунология. -2006г. Том 7. -№3. – С397.

Список сокращений

ВПГ1,2 – вирус простого герпеса 1 и 2 типа

ГИ ВПГ1,2 - герпетической инфекцией, вызванной вирусами простого герпеса 1 и 2 типа

PBS- фосфатно солевой буфер

НСТ-теста

ИС – индекс стимуляции

МПО - миелопероксидаза

КБ – катионные белки

ФЧ – фагоцитарное число

ФИ – фагоцитарный индекс

ИЗ – индекс завершенности

АФК – активные формы кислорода

Спонт. – спонтанный тест

Индук. – индуцированный тест