

005003058

На правах рукописи

ЖЕЛТОВА ОЛЬГА ИГОРЕВНА

**Клинико-иммунологические аспекты цитокинотерапии
хронических рецидивирующих инфекций**

14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

- 1 ДЕК 2011

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата медицинских наук

Новосибирск 2011

Работа выполнена в Учреждении РАМН Научно-исследовательском институте клинической иммунологии Сибирского отделения РАМН

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Останин Александр Анатольевич

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор

Климов Владимир Васильевич

кандидат медицинских наук

Круглесева Ольга Леонидовна

Ведущая организация: Учреждение РАН Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук (г. Екатеринбург)

Защита состоится «*22*» *сентября* 2011 г. в *12⁰⁰* часов на заседании диссертационного совета Д 001.001.01 НИИ клинической иммунологии СО РАМН по адресу: 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИИ клинической иммунологии СО РАМН

Автореферат разослан «*19*» *сентября* 2011 г.

И.о. ученого секретаря диссертационного совета,

доктор медицинских наук



Колесникова Ольга Петровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Несмотря на успехи, достигнутые в лечении и профилактике инфекционных заболеваний, вызванных бактериальной, вирусной или грибковой микрофлорой, увеличивается число тяжелых форм, а также форм с торпидным течением воспалительного процесса, частыми рецидивами и малой эффективностью от адекватной этиотропной и патогенетической терапии [Титов, 2009; Нестерова, 2000; Malkin, 2004; Хантов, 2001]. Длительная персистенция патогенов находится в тесной причинно-следственной взаимосвязи с развитием вторичного иммунодефицита (ВИД), который проявляется снижением механизмов иммунной защиты [Жукова, 2003; Смирнова, 2000; Калинина, 2003; Ahmed, 1996], что клинически манифестирует в виде хронических упорно-рецидивирующих бактериальных или возвратных вирусных инфекций, резистентных к традиционным методам лечения [Нестерова, 2000].

Наиболее типичным представителем рецидивирующих вирусных инфекций является герпетическая инфекция. По данным глобального обзора герпесвирусных исследований, инфицированность/заболеваемость герпесом из года в год нарастает, опережая скорость прироста населения Земли. Многообразие клинических проявлений, особенности возбудителей, возможность их распространения практически всеми известными путями передачи позволили Европейскому региональному бюро ВОЗ отнести герпесвирусные инфекции в группу болезней, которые определяют будущее инфекционной патологии в текущем столетии [Шульженко, 2004; Железничкова, 2005; Arguino, 2006; Walther, 2005]. Важно отметить, что по данным современных эпидемиологических исследований регистрируется не только увеличение количества пациентов с хронической герпетической инфекцией, но также – более тяжелых форм течения заболевания [Латышева, 2001; Самгин, 2002; Ball, 2001; Corey, 2002, Hjalmarsson, 2007, 2009].

Среди бактериальных инфекций наиболее распространены инфекции кожи и подкожно-жировой клетчатки (пиодермия и фурункулез). В экономически развитых странах инфекции кожи и мягких тканей составляют до 1/3 всех инфекционных заболеваний [Новоселов, 2004], а удельный вес пиодермии среди дерматологической патологии варьирует от 17 до 60 % [Масюкова, 2004; Белькова, 2005]. При этом также отмечается неуклонный рост хронических, часто рецидивирующих форм пиодермии, обусловленных различными нарушениями в системе врожденного и адаптивного иммунитета [Сетдикова, 2005].

Принято считать, что в случаях хронизации инфекционно-воспалительного процесса для индукции эффективного противои инфекционного иммунитета и элиминации патогена необходимо проводить иммуностимулирующую терапию. Однако дефект специфического иммунного ответа может быть следствием активации регуляторных Т-клеток (T-reg), и в этом случае иммуностимуляция может потенцировать их супрессорную активность [Mills, 2004; Mitrücker, 2004; Воробьев, 2006; Maurus de la Rosa, 2004]. Такую вероятность нельзя исключать, поскольку иммунные нарушения при рецидивирующих инфекционных заболеваниях не всегда удается четко верифицировать традиционными методами оценки иммунного статуса [Латышева, 2004; Масюкова, 1994].

В связи с этим в данной группе пациентов остается открытым вопрос о проведении патогенетически обоснованной иммуноотропной терапии. Для ответа на этот вопрос актуальным является проведение углубленных иммунологических исследований с привлечением современных методов, позволяющих оценивать функциональную активность иммунокомпетентных клеток, характер продукции Th1/про- и Th2/противовоспалительных цитокинов, а также количество различных субпопуляций Т-

рег. Такой подход позволит получить новые данные об особенностях иммунопатогенеза хронических рецидивирующих инфекций, которые послужат научной основой для разработки более эффективных методов лечения пациентов с хроническими рецидивирующими инфекциями (ХРИ).

На современном фармакологическом рынке постоянно появляются новые иммулотропные препараты. Кроме того, активно идет процесс расширения арсенала методов лабораторной иммунодиагностики и иммуномониторинга, что позволяет клиническим исследователям более точно дифференцировать «точки приложения» не только новых, но и уже хорошо зарекомендовавших себя иммуномодулирующих препаратов. Постоянное обновление наших знаний о механизмах действия иммулотропных препаратов необходимо для последующего целенаправленного их включения в комплексную терапию больных хроническими рецидивирующими инфекциями с целью повышения клинического эффекта от проводимой иммуномодулирующей терапии.

В настоящее время в клинической практике все более широко используются препараты, основой которых являются цитокины. Одним из первых отечественных фармакопейных препаратов, относящихся к этой группе, является Ронколейкин - рекомбинантный интерлейкин-2 (rIL-2) человека. Многолетний опыт применения Ронколейкина при лечении сепсиса, острых гнойно-воспалительных заболеваний, некоторых злокачественных опухолей свидетельствует о его эффективности и безопасности [Брискин, 2000; Останин, 2002; Лобзин, 2001; Молчанов, 2002; Мусалимова, 2007]. Тем не менее, остаются открытыми ряд вопросов. В частности, в отношении пациентов с хроническими рецидивирующими инфекционными заболеваниями не исследована клиническая и иммунокорректирующая эффективность Ронколейкина при его использовании в режиме монотерапии при различных способах введения препарата: в виде подкожных инъекций и виде ингаляций. Кроме того, представляется важным ответить на вопрос: не происходит ли на фоне курсового лечения Ронколейкином экспансии регуляторных супрессорных Т-клеток, что может быть отнесено к побочным, иммулотропным эффектам препарата, поскольку может усилить клинические проявления иммунной недостаточности.

Исходя из вышесказанного, была сформулирована цель работы:

Изучить особенности иммунопатогенеза и оценить эффективность различных вариантов иммунотерапии хронических рецидивирующих инфекций бактериальной и вирусной природы.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Провести сравнительную оценку показателей иммунного статуса, пролиферативной активности Т-клеток, уровня продукции Th1/про- и Th2/противовоспалительных цитокинов, а также количества различных субпопуляций Т-рег в группах здоровых доноров и пациентов с ХРИ.
2. Оценить особенности иммунитета пациентов с ХРИ в зависимости от нозологической формы основного заболевания и природы этиопатогена (бактериальные vs. вирусные инфекции).
3. Разработать протокол клинических испытаний и провести открытое рандомизированное сравнительное исследование по оценке эффективности rIL-2 при подкожном и ингаляционном режимах введения препарата в параллельных группах пациентов с ХРИ.

4. На основе анализа результатов проведенных испытаний оценить безопасность, клиническую эффективность, и иммунокорректирующее действие цитокинотерапии pIL-2.
5. Разработать протокол клинических испытаний и провести пилотное клиническое исследование по оценке переносимости, безопасности и эффективности иммунотерапии с использованием дендритных клеток и pIL-2 в качестве адьюванта у больных рецидивирующей герпетической инфекцией.

Научная новизна.

Впервые показано, что больные с хроническими рецидивирующими инфекционными заболеваниями характеризуются количественным дефицитом активированных CD56⁺CD16⁺NK-клеток, повышенным содержанием регуляторных Т-клеток (CD4⁺CD25^{high} Treg, CD4⁺FoxP3 Treg), сдвигом Th1/Th2 баланса в сторону Th2-клеток, секретирующих IL-4, а также повышенной активностью Т-клеток, секретирующих IL-10. Установлено, что больные с вирусными заболеваниями, в отличие от пациентов с бактериальной инфекцией, характеризуются более выраженными иммунными нарушениями, при этом дисбаланс Th1/Th2 (INF- γ /IL-4) и про-/противовоспалительных (TNF- α /IL-10) цитокинов регистрируется у пациентов независимо от природы этиопатогена. Полученные результаты впервые аргументируют, что патогенетической основой персистенции и хронизации инфекции являются нарушения механизмов врожденного (дефицит NK-клеток) и приобретенного иммунитета (сдвиг Th1/Th2), которые развиваются на фоне количественной экспансии регуляторных супрессорных Т-клеток.

Впервые показано, что Th1-лимфоциты больных с ХРИ сохраняют свой функциональный резерв и способны в ответ на стимуляцию активно продуцировать INF- γ , что доказывает принципиальную возможность коррекции баланса Th1/Th2 цитокинов у больных с хроническими рецидивирующими инфекционными заболеваниями.

При проведении клинических испытаний впервые установлено, что цитокинотерапия pIL-2 (в курсовой дозе 1,5 мг) сопровождается усилением активности Th1-лимфоцитов и снижением уровня продукции IL-10 *in vitro*, и при этом не приводит к развитию побочных, иммуотропных эффектов, связанных с количественной экспансией регуляторных супрессорных Т-клеток. Напротив, при подкожном режиме введения препарата отмечается значимое снижение относительного и абсолютного числа CD4⁺CD25^{high}Treg до уровня нормы. При ингаляционном пути введения препарата содержание CD4⁺CD25^{high}Treg и CD8⁺FoxP3Treg сохраняется стабильно нормальным, а относительное и абсолютное количество CD4⁺FoxP3Treg снижается до уровня, при котором различия с донорами становятся статистически недостоверными.

Практическая значимость

Полученные в работе данные патогенетически обосновывают целесообразность проведения цитокинотерапии с использованием препарата pIL-2 в лечении хронических рецидивирующих инфекций. Результаты рандомизированных клинических исследований показали, что монотерапия pIL-2 позволяет в 65,6% случаев достичь клинически значимого позитивного ответа, который проявляется уменьшением частоты рецидивов, площади поражения и выраженности клинических проявлений, и 4-кратным увеличением длительности безрецидивного периода. Кроме того, впервые показано, что ингаляционный режим цитокинотерапии не уступает по своей эффективности традиционному, подкожному варианту введения препарата pIL-2 (70 и 60% позитивного ответа, соответственно), и позволяет статистически более значимо увеличить продолжительность ремиссии основного заболевания. Показано также, что pIL-2 может

использоваться в качестве адъювантной цитокинотерапии в сочетании с дендритноклеточными вакцинами, и что применение такого подхода в лечении больных с рецидивирующей герпетической инфекцией позволяет уменьшить число и выраженность рецидивов без применения противовирусных препаратов.

Практическое значение проведенных исследований заключается также в том, что в качестве лабораторного маркера клинического ответа на монотерапию препаратом pIL-2 предложено использовать оценку относительного содержания $CD4^+CD25^{high}$ T-reg в периферической крови больных с ХРИ. Показано, что данный тест является высокоинформативным и диагностически значимым (ДК= 6,7, RR= 13,7), и при исходном (до начала лечения) уровне циркулирующих $CD4^+CD25^{high}$ T-reg более 2,0% позволяет с 84,6% специфичностью и 71,4% чувствительностью прогнозировать неэффективность цитокинотерапии.

Положения, выносимые на защиту:

1. Рецидивирующий характер течения хронических инфекционных заболеваний ассоциируется с количественным дефицитом $CD56^+CD16^+$ NK-клеток, повышенным содержанием регуляторных T-клеток, сдвигом цитокинового баланса в сторону Th2-клеток, секретирующих IL-4, а также повышенной активностью T-клеток, секретирующих IL-10.
2. Цитокинотерапия с использованием pIL-2 в лечении больных с хроническими рецидивирующими инфекциями является патогенетически обоснованным подходом, который характеризуется иммунокорректирующим и клинически значимым позитивным эффектом.

Объем и структура диссертации:

Диссертация написана в традиционном стиле и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, глав собственных исследований, обсуждения полученных результатов и выводов. Материал изложен на 124 страницах машинописного текста, включающего 21 таблицу и 8 рисунков. Прилагаемая библиография содержит ссылки на 225 литературных источников, в том числе, 134 иностранных.

Апробация работы:

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на: Всероссийской научной конференции «Молекулярно-генетические основы функционирования цитокиновой сети в норме и при патологии» (Новосибирск, 2010), Всероссийской научно-практической конференции «Дни иммунологии в Сибири» (Красноярск, 2010), Научно-практической конференции с международным участием «Клиническая иммунология, иммуногенетика – междисциплинарные проблемы» (Ташкент, 2010), Всероссийской научно-практической конференции «Дни иммунологии в Сибири» (Абакан, 2011), на 6-ой отчетной конференции ИКИ СО РАМН (Новосибирск, 2011).

Публикации:

По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ, из них 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Благодарности:

Автор диссертации выражает искреннюю благодарность своему научному руководителю А.А. Останину за поддержку и помощь, оказанную при работе над диссертацией; сотрудникам лаборатории клеточной иммунотерапии под руководством д.м.н., профессора Е.Р. Черных и лаборатории клинической иммунопатологии (руководитель лаборатории д.м.н., профессор В.С. Кожевников) НИИ Клинической иммунологии СО РАМН за практическую помощь в проведении экспериментальной части

исследования; сотрудникам иммунологического отделения клиники иммунопатологии под руководством к.м.н. Н.М. Старостиной за помощь в проведении клинической части исследования.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования.

Оценку безопасности и клинической эффективности иммунотерапии с использованием препарата рекомбинантного ИЛ-2 (pIL-2, Ронколейкина) проводили в в дизайне открытого рандомизированного сравнительного исследования в параллельных группах больных с ХРИ. Отбор пациентов в исследование осуществляли согласно критериям включения/исключения. Одним из условий участия пациента в исследовании являлось отсутствие предлеченности какими-либо иммунотропными препаратами в течение последнего месяца, а также добровольный отказ пациента от приема других препаратов в течение всего срока наблюдения. Согласно протоколу, Ронколейкин использовали в виде монотерапии в двух группах пациентов (по 21 больному в группе), различающихся по способам введения препарата (подкожные инъекции и ингаляции). Пациентов относили к той или иной группе методом случайного распределения.

В качестве основного критерия при оценке клинической эффективности иммунотерапии Ронколейкином использовали продолжительность безрецидивного периода и частоту обострений у больных со сроком наблюдения 6 и более месяцев по данным катамнеза. У всех больных оценивали динамику показателей иммунного статуса после завершения терапии Ронколейкином. В исследование было включено 42 пациента в возрасте от 18 до 57 лет с бактериальной (хронический необструктивный бронхит, хронический тонзиллит, обусловленный грамположительной и грамотрицательной микрофлорой, пиодермия) или вирусной (рецидивирующие респираторные инфекции, рецидивирующая герпетическая инфекция (РГИ) [вирус простого герпеса 1 и/или 2 типа]) инфекцией, с частотой рецидивов основного заболевания ≥ 6 раз/год. Средний возраст пациентов, составил $30,7 \pm 1,5$ года. Группа обследуемых больных включала 9 мужчин (21,4 %) и 33 женщины (78,6 %). Среди обследованных пациентов у 30 больных выявлялась вирусная инфекция: РГИ ($n=21$) и рецидивирующие респираторные инфекции ($n=9$). У 12 человек выявлялись различные варианты бактериальной инфекции: хронический тонзиллит ($n=3$), хронический бронхит ($n=1$), рецидивирующий фурункулез/пиодермия ($n=8$). Продолжительность основного заболевания составляла в среднем по группе - $7,6 \pm 1,0$ лет (от 1 года до 23 лет), при этом частота ежегодных обострений варьировала от 6 до 25, составляя в среднем $10,5 \pm 0,7$ в год. Длительность межрецидивного периода варьировала от 14 дней до 2 месяцев, (в среднем $1,3 \pm 0,07$ месяца).

Для разных целей из венозной гепаринизированной крови выделяли стандартными методами лейкоцельзу и мононуклеарные клетки (МНК).

Для поверхностного маркирования иммунокомпетентных клеток использовали моноклональные антитела к CD3, CD4, CD8, CD20, CD16, CD25, HLA-DR, меченные флюоресцином изотиоцианатом (FITC), фикоэритрином (PE), перидинин хлорофил протеином (PerCP) и аллофикоцианином (APC) в количестве, рекомендуемом производителем (Сорбент и МедБиоСпектр, Москва, Россия; BD Biosciences Pharmingen, USA). Процент лимфоцитов определяли с помощью проточного цитометра FACSCalibur (Becton Dickinson, USA) в программе CellQuest (Becton Dickinson, USA), используя параметры прямого (FSC), бокового (SSC) светорассеяния и канала флюоресценции (FL-2). Процент позитивных клеток, экспрессирующих $CD4^+CD25^+$, определяли среди 10000 клеток в лимфоцитарном регионе. При определении субпопуляции $CD4^+CD25^{high}$

учитывали клетки с наибольшей интенсивностью свечения CD25. Для оценки внутриклеточной экспрессии FOXP3 в CD4⁺ и в CD8⁺T-клетках, МНК обрабатывали FITC-мечеными анти-CD4 или анти-CD8 МАТ («Сорбент», Москва). Пермеабиллизацию клеток проводили с использованием 0,2% раствора Твин-20, после чего клетки культивировали 30 мин с PE-мечеными анти-FOXP3 антителами («Bioscience, США).

Культивирование лимфоцитов. МНК культивировали в 96-луночных круглодонных планшетах для иммунологических исследований при температуре 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Полная культуральная среда состояла из среды RPMI-1640, дополненной 10% инактивированной сыворотки доноров АВ (IV) группы, 2мМ HEPES-буфера, 0,3 мг/мл глутамина (все реактивы фирмы Sigma) и гентамицином (100 мкг/мл). Количество МНК, вносимых в лунку, составляло 0,1 x 10⁶ клеток в 0,15 мл культуральной среды. Для стимуляции клеток использовали моноклональные анти-CD3 антитела (СО-90, «Медбиоспектр», Москва) в концентрации 1 мкг/мл, и митоген конканавалин А в дозе 15 мкг/мл (Sigma). Интенсивность пролиферации оценивали через 72 ч по включению в нуклеопротеидные фракции клеток ³H-тимидина, вносимого за 18 ч до окончания культивирования в дозе 1 мКию/лунку. Подсчет радиоактивности материала производили в жидкостном сцинтиляционном счетчике SL - 30 (Intertechnic, Франция). Результаты представляли в виде среднего счета (имп/мин).

Производство цитокинов (TNF-α, INF-γ, IL-4, IL-10) в 48-часовых супернатантах нестимулированных и анти-CD3-стимулированных МНК оценивали методом ИФА с использованием соответствующих тест-систем в соответствии с инструкцией фирмы-производителя («Протеиновый контур», Санкт-Петербург, Россия для IL-4 и «Вектор-Бест», Новосибирск, Россия для INF-γ, TNF-α и IL-10).

Исследование фагоцитоза и продукции перекиси водорода. Функциональную активность фагоцитарных клеток оценивали по показателю активации нейтрофилов, определяемому по продукции перекиси водорода клетками после стимуляции зимозаном. Результат оценивали на многоканальном спектрофотометре (Multiskan MS, Labsystems, Финляндия) по интенсивности окрашивания пробы, которое происходило за счет окисления ортофенилдиамина в процессе катаболизма перекиси водорода. Фагоцитарную активность гранулоцитов и моноцитов оценивали методом проточной цитометрии после инкубации выделенных клеток с латексом, меченым FITS.

Уровень иммуноглобулинов А, М, G в сыворотке крови определяли на многоканальном спектрофотометре с использованием соответствующих наборов реагентов («НПО СИНТЭКО», Россия) согласно инструкции фирмы-производителя.

Математическую обработку полученных результатов проводили методами описательной, параметрической и непараметрической статистики на персональном компьютере с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0 для Windows.

С целью оценки эффективности специфической иммунотерапии у больных рецидивирующей герпетической инфекцией было проведено дополнительное проспективное контролируемое пилотное клиническое исследование. Лечение проводили согласно протоколу, утвержденному решением Ученого Совета и Локального этического комитета, после подписания пациентами информированного согласия. В исследование включали пациентов от 18 до 60 лет в период ремиссии с резистентным течением заболевания при использовании стандартных методов противовирусной терапии.

В исследование было включено 7 женщин в возрасте от 22 до 48 (средний возраст – 29,7±3,5лет) с орофациальной локализацией РГИ. Длительность заболевания составила в среднем 18,3±1,3 года (от 15 до 25 лет), а количество обострений от 8 до 15 в год, за полгода до начала лечения – 6±0,5 рецидивов.

На предварительном этапе проводили генерацию IFN-альфа-индуцированных дендритных клеток (IFN-ДК) из фракции прилипающих к пластику МНК в течение 3 сут в среде RPMI-1640 (Sigma, США) в присутствии GM-CSF (Sigma, США) 40 нг/мл и INF- α 1000 ЕД/мл (Роферон-А, Roche, Швейцария) с последующим дозреванием в течение 24 ч в присутствии полиоксидония в дозе 2 нг/мл («ПетроваксФарм», Москва). ДК нагружали специфическим рекомбинантным антигеном HSV1gD («Диагностические системы», Нижний Новгород) в дозе 5 мкг/мл и криоконсервировали для последующего использования. Лечение проводили в два курса. Первый - включал 4-6 подкожных инъекций IFN-ДК (5×10^6 клеток) с 2-недельным интервалом. Второй (через 3 мес после завершения первого) - 3-6 вакцинаций с кратностью 1 раз в месяц. В качестве адьюванта использовали Ронколейкин (п/к в дозе 0,25 мг). Оценку лечения проводили после первого и второго курсов, а также через 6 мес после завершения терапии. Основным критерием эффективности являлось увеличение продолжительности межрецидивного периода. Интенсивность специфического ответа оценивали по пролиферации МНК в ответ на стимуляцию HSV1gD антигеном (5 мг/мл) в отсутствие и присутствие Ронколейкина (100 Ед/мл). Неспецифический ответ оценивали по пролиферации МНК в ответ на стимуляцию конканавалином А. Интенсивность пролиферации оценивали на 3 сутки.

Результаты и обсуждение.

Особенности иммунопатогенеза ХРИ. На первом этапе был проведен анализ иммунного статуса больных с хронической рецидивирующей бактериальной и вирусной инфекцией до начала курса иммунотерапии.

Табл. 1. Показатели иммунного статуса в группах здоровых доноров и пациентов с ХРИ

ПОКАЗАТЕЛЬ	Доноры, n=30 M \pm SE (LQ - UQ)	Больные, n=42 M \pm SE
Абс. лимфоцитоз ($\times 10^9/L$)	1,87 \pm 0,14 (1,45 - 2,23)	2,21 \pm 0,1 *
CD3 ⁺ Т-лимфоциты (%)	76,1 \pm 1,48 (74,0 - 80,0)	78,8 \pm 1,02
CD4 ⁺ Т-лимфоциты (%)	45,32 \pm 0,93 (42,0 - 50,0)	48,17 \pm 1,25
CD8 ⁺ Т-лимфоциты (%)	29,94 \pm 1,24 (25,0 - 34,0)	31,52 \pm 1,2
CD3 ⁺ Т-лимфоциты ($\times 10^9/L$)	1,15 \pm 0,07 (0,94 - 1,27)	1,74 \pm 0,08
CD4 ⁺ Т-лимфоциты ($\times 10^9/L$)	0,81 \pm 0,06 (0,61 - 0,93)	1,05 \pm 0,047 *
CD8 ⁺ Т-лимфоциты ($\times 10^9/L$)	0,61 \pm 0,05 (0,46 - 0,67)	0,69 \pm 0,04
CD20 ⁺ В-клетки (%)	9,58 \pm 0,86 (7,0 - 12,0)	9,67 \pm 0,88
CD16 ⁺ NK-клетки (%)	14,17 \pm 1,67 (8,5 - 19,5)	12,17 \pm 0,78
CD16 ⁺ CD56 ⁺ NK-клетки (%)	8,69 \pm 0,5 (7,0 - 11,0)	5,83 \pm 0,46 *
CD16 ⁺ CD56 ⁺ NK-кл ($\times 10^9/L$)	0,18 \pm 0,017 (0,14 - 0,22)	0,13 \pm 0,013 *
HLA-DR моноциты (%)	62,8 \pm 4,3 (52,0 - 76,0)	66,9 \pm 1,6
ПАН (усл. ед.)	4,24 \pm 0,29 (2,9 - 5,3)	4,93 \pm 0,39
Фагоцитоз моноцитов (%)	57,9 \pm 1,05 (53,0-62,0)	54,9 \pm 1,25
Фагоцитоз гранулоцитов (%)	65,1 \pm 1,3 (56,0 - 73,5)	66,07 \pm 1,27
Пролиферация (имп/мин)		
Спонтанная	234 \pm 32,6 (130-270)	333 \pm 72
Анти-CD3-индуцированная	23760 \pm 2799 (14 520 - 33500)	23067 \pm 1583
ИВCR3-нат	139,8 \pm 20,7 (104,4 - 176,7)	129,4 \pm 16,2

Примечание: здесь и далее n - количество наблюдений, данные представлены в виде M \pm SE - средняя \pm стандартная ошибка. LQ - UQ - нижнее и верхнее квартильное (25%) отклонение. * - $p_0 < 0,05$ достоверность различий между группами

В целом по группе обследованных больных регистрировалось статистически достоверное увеличение общего лимфоцитоза и абсолютного количества CD4⁺Т-лимфоцитов. Других изменений в Т-клеточном, В-клеточном, моноцитарном макрофагальном звеньях иммунитета выявлено не было (табл. 1). Тем не менее, у пациентов регистрировалось достоверное снижение относительного и абсолютного содержания активированных CD16⁺CD56⁺NK-клеток. Следует отметить, что у 30 из 42 обследованных больных (т.е. более чем в 70% случаев) отмечался наиболее выраженный дефицит активированных CD16⁺CD56⁺NK-клеток, при котором индивидуальные значения выходили за нижнюю границу квартильного диапазона здоровых доноров (<7%). Кроме того, у 10 из 42 обследованных больных реактивность Т-клеток в ответ на стимуляцию через CD3-Т-клеточный рецепторный комплекс была снижена более чем в 2 раза (10800 ± 740 против 23760 ± 2799 имп/мин у здоровых доноров), что свидетельствует о низкой функциональной активности циркулирующих Т-лимфоцитов.

Выявленные иммунные нарушения могли быть взаимосвязаны с изменениями в компартменте регуляторных супрессорных Т-клеток (Т-рег), поскольку регистрировались на фоне увеличения абсолютного количества CD4⁺Т-лимфоцитов. Поэтому дополнительно исследовали абсолютное и относительное содержание в крови основных субпопуляций Т-рег – CD4⁺CD25⁺Т-клеток (в том числе высоко экспрессирующих CD25 антигены – CD4⁺CD25^{high}), а также CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитов с внутриклеточной экспрессией FoxP3 – фактора транскрипции специфичного для Т-рег. Из данных, представленных на рисунке 1 видно, что в целом по группе пациентов с ХРИ было выявлено достоверное увеличение относительного и абсолютного содержания CD4⁺Т-рег, высоко экспрессирующих CD25 антиген, а также CD4⁺FoxP3⁺Трег. При этом больные не отличались от здоровых доноров по количеству CD8⁺FoxP3⁺Трег. Тем не менее, корреляционный анализ выявил наличие статистически значимой обратной корреляционной взаимосвязи между содержанием CD8⁺FoxP3⁺Трег и уровнем пролиферативного ответа Т-клеток в анти-CD3-стимулированных культурах ($r_s = -0,54$; $p = 0,02$), что свидетельствует о возможном участии не только CD4⁺, но и CD8⁺Т-регуляторных клеток в нарушении параметров Т-клеточного иммунитета у пациентов с ХРИ.

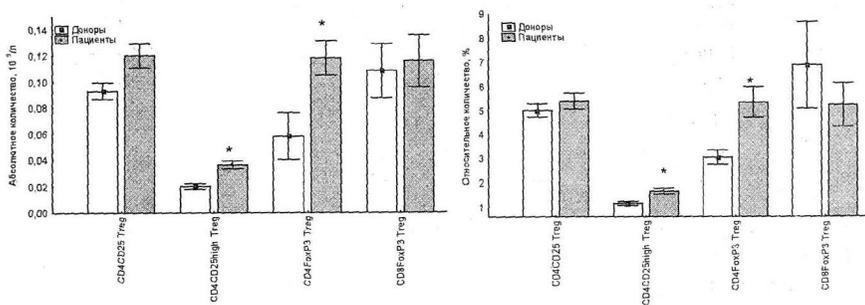


Рис. 1 Сравнительная оценка абсолютного и относительного количества различных субпопуляций Т-рег в группах здоровых доноров и пациентов с ХРИ

Примечания: * - $p < 0,05$ достоверность различий между группами

Учитывая выявленные изменения в компартменте регуляторных супрессорных Т-клеток, представлялось важным оценить цитокин-секреторную активность Т-лимфоцитов больных с хронической, рецидивирующей инфекцией. Для этого, был проведен сравнительный анализ интенсивности спонтанной и анти-CD3-стимулированной

продукции Th1- (IFN- γ) и Th2- (IL-4), а также про- (TNF- α) и противовоспалительных цитокинов (IL-10) в 48-часовых супернатантах МНК здоровых доноров и пациентов с ХРИ. В отсутствие какой-либо стимуляции Т-клетки больных активно продуцируют IL-4, что приводит к смещению Th1/Th2 баланса на фоне нормального уровня продукции IFN- γ (табл. 2). В анти-CD3-стимулированных культурах интенсивность продукции IL-4 значимо не меняется, что указывает на то, что у пациентов с ХРИ Th2-клетки находятся в активированном состоянии и не отвечают на дополнительные стимулы.

Табл. 2 Спонтанная и анти-CD3-стимулированная продукция цитокинов в группах здоровых доноров и пациентов с ХРИ

Цитокины (пкг/мл)	Спонтанная		Анти-CD3-стимулированная	
	Доноры (n=5)	Больные (n=18)	Доноры (n=5)	Больные (n=18)
IFN- γ	27,1 \pm 22,2	24,6 \pm 16,5	2135 \pm 951	3921,95 \pm 314
IL-4	12,5 \pm 6,2	102,6 \pm 16,6 *	107 \pm 15	118,93 \pm 15,5
IFN- γ /IL-4	6,3 \pm 4,9	0,224 \pm 0,11 *	17,1 \pm 6,2	45 \pm 7,5 *
TNF- α	192 \pm 61,6	206,4 \pm 65,3	1120 \pm 98	1208,7 \pm 33
IL-10	7,4 \pm 0,7	25,9 \pm 4,9 *	93,6 \pm 46,7	255 \pm 39,1 *
TNF- α /IL-10	29,4 \pm 12,2	12,2 \pm 3,5 *	25,2 \pm 9,5	6,9 \pm 1,2 *

Примечание: представлены также значения (расч.ед.) индексов соотношения IFN- γ /IL-4 и TNF- α /IL-10, отражающих баланс продукции Th1/Th2, а также про- и противовоспалительных цитокинов, соответственно.

Тем не менее, продукция IFN- γ в ответ на митогенную стимуляцию у больных возрастает даже в большей степени, чем у здоровых доноров (до 3921,95 \pm 314 против 2135 \pm 951 пкг/мл). В результате индекс соотношения IFN- γ /IL-4, отражающий баланс продукции Th1/Th2 цитокинов, в среднем по группе пациентов с ХРИ достоверно выше, чем у здоровых доноров (45 \pm 7,5 против 17,1 \pm 6,2 расч.ед., $p < 0,05$). Эти данные свидетельствуют о том, что Th1-лимфоциты больных с ХРИ сохраняют свой функциональный резерв и способны в ответ на стимуляцию активно продуцировать IFN- γ , тогда как Th2-лимфоциты остаются рефрактерными к митогенным стимулам. Т-клетки пациентов с ХРИ отличались также высоким уровнем спонтанной и анти-CD3-стимулированной продукции IL-10, тогда как продукция TNF- α была сопоставима с нормативными значениями здоровых доноров. Как следствие у больных регистрировалось 3-4-кратное снижение индекса соотношения TNF- α /IL-10 как в спонтанных, так и в анти-CD3-стимулированных культурах (до 12,2 \pm 3,5 и 6,9 \pm 1,2 против 29,4 \pm 12,2 и 25,2 \pm 9,5 расч.ед. у здоровых доноров, $p < 0,05$). В этой связи следует отметить, что поскольку продукция IL-10 характерна для популяции индуцибельных T-reg, то выявленное усиление синтеза данного цитокина в культурах МНК больных с ХРИ может косвенно свидетельствовать об их повышенной функциональной активности, которая проявляется как в отсутствие какой-либо стимуляции, так и дополнительно усиливается в ответ на активационный стимул.

Таким образом, можно заключить, что по данным обычного иммунного статуса пациенты с хроническими рецидивирующими инфекциями практически не отличаются от здоровых доноров по параметрам В-клеточного, моноцитарно-фагоцитарного и Т-клеточного звена иммунитета (за исключением повышенного лимфоцитоза и абсолютного количества CD4Т-лимфоцитов). Тем не менее, дополнительные исследования четко визуализируют количественный дефицит активированных NK-клеток, сдвиг Th1/Th2 баланса в сторону Т-клеток, секретирующих IL-4, а также повышенную активность Т-клеток, секретирующих IL-10, что свидетельствует об иммунных нарушениях, которые

развиваются на фоне количественной экспансии регуляторных супрессорных Т-клеток и являются патогенетической основой персистенции и хронизации инфекции.

При сравнительном анализе пациентов с бактериальной и вирусной инфекцией было установлено, что больные с заболеваниями вирусной природы характеризовались более выраженными иммунными нарушениями. Именно в этой подгруппе регистрировалось статистически значимое увеличение общего лимфоцитоза, относительного и абсолютного количества CD4Т-лимфоцитов, в том числе CD4⁺CD25^{high} Treg и CD4⁺FoxP3 Treg, а также количественный дефицит активированных НК-клеток. У пациентов с бактериальной инфекцией эти показатели были изменены в меньшей степени, и достоверно было снижено только процентное содержание НК-клеток. Тем не менее, дисбаланс Th1/Th2 цитокинов, а также про- и противовоспалительных цитокинов за счет повышенной продукции ИЛ-4 и ИЛ-10 регистрировался у больных независимо от природы этнопатогена.

Имунокорректирующая и клиническая эффективность иммунотерапии с использованием pIL-2. По разработанному протоколу было пролечено 42 больных. Из них 21 больной получили курсовое лечение в виде подкожных инъекций Ронколейкина в дозе 0,5 мг, №3 через день, оставшиеся 21 пациента с ХРИ – в виде ингаляций препарата в дозе 0,5 мг, №3 через день. Сформированные методом случайного распределения на основании критериев включения/исключения подгруппы были сопоставимы по полу, возрасту, основным нозологическим формам и длительности заболевания, по частоте рецидивов и средней продолжительности межрецидивного периода, а также по параметрам иммунного статуса.

В динамике проводимой терапии у пациентов с ХРИ, получивших курсовое лечение Ронколейкином как в режиме подкожных инъекций, так и в режиме ингаляций, основные параметры Т-, В-клеточного и моноцитарно-фагоцитарного звеньев иммунитета не претерпевали каких-либо выраженных изменений и сохранялись на уровне донорских значений.

Оценка параметров цитокинового статуса в динамике проводимой иммунотерапии также не выявила значимых различий в подгруппах больных, получавших Ронколейкин в режиме подкожных инъекций или ингаляционно (табл.3). Через 48 ч после последнего введения препарата в нестимулированных культурах пациентов с ХРИ сохранялась повышенная активность Т-клеток, секретирующих ИЛ-4 и ИЛ-10, а индексы соотношения IFN-γ/IL-4 и TNF-α/IL-10 оставались на исходно низком уровне. Тем не менее, следует отметить, что после курсового подкожного введения Ронколейкина, Т-клетки пациентов с ХРИ в ответ на анти-CD3-стимуляцию секретируют IFN-γ на уровне 2-кратно превышающем донорские значения (4356 ± 363 против 2135 ± 951 пкг/мл, $p < 0,05$). Эти данные свидетельствуют об усилении функциональной активности Th1-лимфоцитов на фоне проводимой терапии. При этом характер продукции TNF-α и ИЛ-10 в анти-CD3-стимулированных культурах значимо не менялся. Несколько иная картина отмечалась в подгруппе больных с ингаляционным введением Ронколейкина. В анти-CD3-стимулированных культурах этих больных не отмечалось дополнительного прироста активности Th1-клеток, секретирующих IFN-γ, и баланс Th1/Th2 цитокинов (индекс соотношения IFN-γ/IL-4) сохранялся на исходном уровне, который достоверно превышал нормативные значения здоровых доноров. Тем не менее, в данной подгруппе на фоне проводимой иммунотерапии регистрировалось ослабление анти-CD3-индуцированной продукции ИЛ-10, в результате чего различия в уровне секреции ИЛ-10 и в индексе соотношения TNF-α/IL-10 становились статистически недостоверными по сравнению с аналогичными показателями здоровых доноров.

Табл. 3. Продукция цитокинов в динамике проводимой иммунотерапии

Продукция цитокинов (пкг/мл)	Доноры (n=5)	Режимы иммунотерапии Ронколейкином			
		п/к введение (n=9)		Ингаляции (n=9)	
		До ИТ	После ИТ	До ИТ	После ИТ
Спонтанная					
IFN- γ	27,1 \pm 22,2	41,1 \pm 33,0	14,3 \pm 6,9	8,0 \pm 2,1	8,5 \pm 2,1
IL-4	12,5 \pm 6,2	107,1 \pm 21,7	141,2 \pm 26 *	98,0 \pm 26,5	103,3 \pm 18,9 *
TNF- α	192 \pm 61,6	288,8 \pm 124	348 \pm 99	124 \pm 29,8	97,9 \pm 32,7
IL-10	7,4 \pm 0,7	29,9 \pm 7,3	28,5 \pm 6,0 **	21,9 \pm 6,5 *	17,7 \pm 5,9 *
анти-CD3-индуцированная					
IFN- γ	2135 \pm 951	3960 \pm 450	4584 \pm 315 *	3884 \pm 465	3560 \pm 443
IL-4	107 \pm 15	120,6 \pm 17,8	107,4 \pm 12,2	117,2 \pm	78,6 \pm 11
TNF- α	1120 \pm 98	1155 \pm 51	1198 \pm 54	1262 \pm 35	1099 \pm 68
IL-10	93,6 \pm 46,7	221 \pm 41 *	236 \pm 72 *	289 \pm 67 *	138,5 \pm 25,5

Примечания: * - $p_U < 0,05$, достоверность различий по сравнению с донорами (U критерий Вилкоксона-Манна-Уитни)

Одной из задач исследования являлась проверка гипотезы, что курсовое лечение с использованием pIL-2 (препарата «Ронколейкин») может сопровождаться развитием побочных иммуотропных эффектов, связанных с экспансией регуляторных супрессорных клеток, высоко экспрессирующих рецепторы для IL-2 (CD4⁺CD25^{high} Treg).

Табл. 4. Субпопуляции Treg в динамике проводимой иммунотерапии

Показатель	Доноры	Режимы иммунотерапии	
		Ингаляции (n=21)	
		До ИТ	После ИТ
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg (%)	5,0 \pm 0,28	5,78 \pm 0,53	4,93 \pm 0,39
CD4 ⁺ CD25 ^{high} Treg (%)	1,31 \pm 0,12	1,52 \pm 0,16	1,55 \pm 0,27
CD4 ⁺ FoxP3 Treg (%)	3,03 \pm 0,29	5,0 \pm 0,86 *	4,23 \pm 0,89
CD8 ⁺ FoxP3 Treg (%)	6,88 \pm 1,8	4,1 \pm 0,98	3,6 \pm 1,035
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg (x 10 ⁹ /L)	0,09 \pm 0,0064	0,13 \pm 0,015	0,11 \pm 0,01
CD4 ⁺ CD25 ^{high} Treg (x 10 ⁹ /L)	0,025 \pm 0,0025	0,034 \pm 0,004	0,039 \pm 0,007
CD4 ⁺ FoxP3 Treg (x 10 ⁹ /L)	0,06 \pm 0,018	0,112 \pm 0,018 *	0,098 \pm 0,017
CD8 ⁺ FoxP3 Treg (x 10 ⁹ /L)	0,11 \pm 0,02	0,09 \pm 0,021	0,075 \pm 0,015
Показатель	Доноры	Режимы иммунотерапии	
		П/к (n=21)	
		До ИТ	После ИТ
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg (%)	5,0 \pm 0,28	5,0 \pm 0,4	4,31 \pm 0,41
CD4 ⁺ CD25 ^{high} Treg (%)	1,31 \pm 0,12	1,74 \pm 0,17 *	1,48 \pm 0,29
CD4 ⁺ FoxP3 Treg (%)	3,03 \pm 0,29	5,75 \pm 0,94 *	6,9 \pm 0,92 *
CD8 ⁺ FoxP3 Treg (%)	6,88 \pm 1,8	6,63 \pm 1,52	5,8 \pm 1,18
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg (x 10 ⁹ /L)	0,09 \pm 0,0064	0,11 \pm 0,011	0,09 \pm 0,014
CD4 ⁺ CD25 ^{high} Treg (x 10 ⁹ /L)	0,025 \pm 0,0025	0,04 \pm 0,004 *	0,03 \pm 0,005
CD4 ⁺ FoxP3 Treg (x 10 ⁹ /L)	0,06 \pm 0,018	0,125 \pm 0,019 *	0,133 \pm 0,02 *
CD8 ⁺ FoxP3 Treg (x 10 ⁹ /L)	0,11 \pm 0,02	0,145 \pm 0,035	0,12 \pm 0,03

Примечания: * - $p_U < 0,05$ достоверность различий по сравнению с донорами

Сравнительный анализ компартамента Т-рег-клеток (табл. 4) у пациентов с ХРИ, получивших лечение в виде подкожных инъекций Ронколейкина, показал снижение относительного и абсолютного количества $CD4^+CD25^{high}$ Treg через 48 ч после завершения курса иммунотерапии, тогда как содержание $CD4^+$ FoxP3Treg сохранялось на исходно повышенном уровне. В подгруппе больных с ХРИ, получавших курсовое лечение Ронколейкином в виде ингаляций, содержание $CD4^+CD25^{high}$ T-клеток сохранялось стабильным и оставалось в границах нормативных значений. При этом регистрировалось отчетливое снижение относительного и абсолютного количества $CD4^+$ FoxP3T-reg до уровня, при котором различия с донорами становились статистически недостоверными.

В соответствии с разработанным протоколом клинических испытаний в качестве основного критерия при оценке клинической эффективности иммунотерапии Ронколейкином использовали продолжительность безрецидивного периода, а также частоту обострений у больных со сроком наблюдения 6 и более месяцев. Данные катанеза были собраны о 40 из 42 пролеченных больных. Характер ответа пациентов с ХРИ на проведенную иммунотерапию Ронколейкином классифицировали по 3 категориям: 1 – позитивный эффект (уменьшение числа рецидивов; увеличение продолжительности межрецидивного периода; уменьшение площади поражения (у больных герпесом, пиодермией/фурункулезом) и выраженности клинических проявлений); 2 - без эффекта (отсутствие изменений в частоте рецидивов и продолжительности межрецидивного периода до и после лечения); 3 – негативный эффект (увеличение числа рецидивов и сокращение межрецидивного периода, увеличение площади поражения, тяжести обострений).

В целом по группе (n=40) позитивный клинический эффект был зарегистрирован в 65% случаев (у 26 больных). В частности, уменьшение частоты рецидивов выявлено у 12/26 (46,2%) больных. Уменьшение площади поражения и выраженности клинических проявлений у 3/26 (11,5%) больных. Снижение частоты обострений в сочетании с уменьшением выраженности клинических проявлений у 11/26 (42,3%) пациентов. Продолжительность клинического эффекта варьировала от 3 до 7 месяцев, составляя в среднем $4,37 \pm 0,24$ месяца.

На рисунке 2 представлены результаты сравнительного анализа клинической эффективности иммунотерапии Ронколейкином в зависимости от режима введения препарата. Видно, что позитивный клинический эффект был достигнут у 60% (12/20) пациентов с ХРИ при использовании Ронколейкина в виде подкожных инъекций (в дозе 0,5 мг, №3 через день), и у 70% (14/20) больных – при использовании ингаляций (Ронколейкин в дозе 0,5 мг, разведенный в 7-8 мл раствора для инъекций, №3 через день). Более высокая эффективность ингаляционного режима не была статистически значимой из-за малого числа наблюдений и регистрировалась в виде тенденции.



Рис. 2. Эффективность иммунотерапии Ронколейкином в лечении пациентов с ХРИ
Примечание: $R_{ТМФ}$ – достоверность различия частот (метод Фишера)

Применение Ронколейкина у больных с рецидивирующими вирусными инфекциями сопровождалось развитием положительного клинического эффекта в 71,4% случаев, тогда как при хронических инфекционных заболеваниях бактериальной природы – в 50% случаев.

В целом по группе пациентов с ХРИ, ответивших на проведенную иммунотерапию, продолжительность межрецидивного периода до начала лечения составляла в среднем $1,2 \pm 0,09$ мес. Временной интервал до развития 1-го рецидива после окончания терапии Ронколейкином варьировал от 0,5 до 7 мес, составляя в среднем $2,61 \pm 0,36$ мес ($P_w=0,0004$). При этом большинство больных отмечали, что даже в случае раннего рецидивирования заболевания, последующих обострений либо не было вообще, либо их количество значительно уменьшалось, при этом эффект сохранялся в отдельных случаях до 5-7 мес.

В 35% случаев (14/40) иммунотерапия была проведена без значимого эффекта.

Сравнительный анализ демографических, клинических, общелабораторных показателей и «рутинных» параметров иммунного статуса не выявил значимых различий в подгруппах больных, ответивших («респондеры», $n=26$) и не ответивших («нереспондеры», $n=14$) на терапию Ронколейкином. Тем не менее, оценка компартамента регуляторных Т-клеток, показала, что пациенты, не ответившие на лечение, отличались от группы «респондеров» повышенным уровнем относительного содержания $CD4^+$ Т-лимфоцитов, высокоэкспрессирующих $CD25$ антиген ($CD4^+CD25^{high}Treg$ $2,07 \pm 0,16$ против $1,44 \pm 0,15\%$, $p_U < 0,05$).

В целом по группе пролеченных больных ХРИ ($n=40$) между уровнем относительного содержания $CD4^+CD25^{high}Treg$ и эффективностью иммунотерапии Ронколейкином была выявлена обратная корреляционная взаимосвязь ($r_s = -0,44$; $p=0,005$).

Эти результаты послужили основанием для анализа операционных характеристик теста прогнозирования клинического ответа на Ронколейкин, основанного на определении относительного содержания регуляторных $CD4^+CD25^{high}T$ -клеток. Для этого была построена характеристическая кривая (receiver-operator curve, ROC).

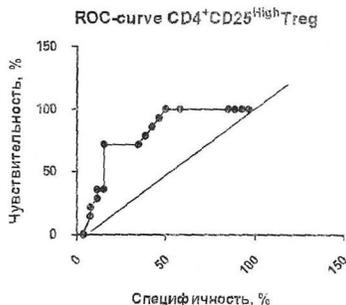


Рис. 3. ROC-кривая, иллюстрирующая отношение между чувствительностью и специфичностью для различных точек разделения относительного содержания $CD4^+CD25^{high}T-reg$ в раннем прогнозе клинического ответа на Ронколейкин.

Площадь под кривой для данного теста составила 0,79 (95% ДИ 0,66 – 0,93, $p=0,002$).

Из данных таблицы 5 видно, что исходно повышенный уровень регуляторных $CD4^+CD25^{high}T$ -клеток ($> 2,0\%$) достоверно чаще встречается в группе больных, где монотерапия Ронколейкином была малоэффективной (в 71,4% случаев против 15,4% в группе больных-респондеров, $p_{\text{Тайф}}=0,0011$).

Увеличение относительного количества Т-reg более 2,0% характеризовалось высоким диагностическим коэффициентом (ДК=6,7), информативность которого составляла 2,22. Обнаружение у больных ХРИ повышенного содержания $CD4^+CD25^{high}T$ -клеток ассоциируется с 13-кратным увеличением относительного риска малоэффективного использования Ронколейкина в режиме монотерапии (RR=13,7).

Табл. 5 Информативность определения относительного содержания $CD4^+CD25^{high}T-reg$ в раннем прогнозе клинического ответа на Ронколейкин

Тест	Частота % P(Xi/Ak)		ДК	SN %	SP %	J(Sh)	RR
	A ₁	A ₂					
$CD4^+CD25^{high}Treg > 2,0\%$	15,4	71,4**	6,7	71,4	84,6	2,22	13,7

Примечание: A₁ и A₂ – классы прогноза, где A₁ составили пациенты ХРИ, ответившие на терапию Ронколейкином (n=26) и A₂ – больные-нереспондеры (n=14). ДК – диагностический коэффициент; SN – чувствительность и SP – специфичность признака; J(Sh) – информативность по К.Шеннону; RR – относительный риск. ** - p=0,0011, достоверность различий частот рассчитана точным методом Фишера.

Таким образом, полученные нами результаты четко показывают, что исходная оценка уровня циркулирующих $CD4^+CD25^{high}T-reg$ может быть использована врачом, принимающим решение о проведении иммунотерапии Ронколейкином, для раннего прогноза вероятности достижения значимого клинического эффекта.

Эффективность специфической иммунотерапии с использованием ДК-вакцин и Ронколейкина в качестве адъюванта. На заключительном этапе работы было проведено отдельное клиническое исследование с целью оценки безопасности и эффективности специфической иммунотерапии с использованием INF-ДК в комбинации с Ронколейкином у больных с рецидивирующей герпетической инфекцией. Клинические испытания проводили в дизайне открытого проспективного пилотного исследования с контролем «до-после».

Проведение специфической иммунотерапии по разработанной схеме характеризовалось хорошей переносимостью, не вызывало местных и системных аллергических и/или воспалительных реакций.

При анализе клинической эффективности было показано (рис. 4) достоверное уменьшение числа обострений на фоне лечения ($4,0 \pm 0,7$ против $5,93 \pm 0,48$ эпизодов до лечения; $p_u < 0,05$) и в течение последующих 6 месяцев наблюдения ($2,4 \pm 0,97$; $p_u < 0,05$). Соответственно, межрецидивный период на фоне терапии возрос до $81,6 \pm 13,8$ дней, а в период 6 мес наблюдения после терапии составил $67,1 \pm 16,2$ дня, что было достоверно выше соответствующего показателя до лечения ($18,7 \pm 3,2$; $p_u < 0,05$).

При этом у 3 пациентов в период 6-месячного наблюдения не было зарегистрировано ни одного обострения, а у 4-х имевших рецидивы, обострения протекали в более легкой форме с меньшей площадью высыпаний и степенью выраженности интоксикации.

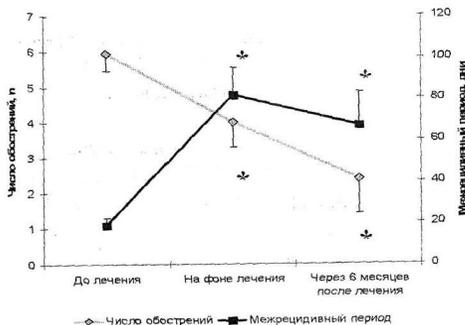


Рис. 4 Клиническая эффективность специфической иммунотерапии.

* - достоверность различий по сравнению с показателями до лечения, $p_u < 0,05$, u-критерий Вилкоксова-Манна-Уитни

Исследование антиген-специфического и митоген-индуцированного пролиферативного ответа в культурах МНК больных показало, что исходно пациенты с герпесвирусной инфекцией характеризовались сниженным уровнем Кон-А стимулированной пролиферации (12314 ± 1840 против 49240 ± 3990 имп/мин у здоровых доноров, $p < 0,05$) и отсутствием реактивности на стимуляцию вирусным антигеном (табл. 6). После первого курса ДК-вакцинаций (через 3 мес от начала лечения) ИВ_{АГ} возрастал в среднем в 5 раз, что свидетельствовало о появлении антигенной реактивности МНК. Однако интенсивность митогенной реактивности Т-клеток оставалась низкой. По завершению второго курса ДК-вакцинаций (через 12 мес после начала лечения) интенсивность антигенспецифического ответа сохранялась на достаточно высоком уровне (ИВ_{АГ} $3,8 \pm 1,6$ расч. ед.), при этом отмечалось 2-кратное усиление митогенной реактивности Т-клеток ($p < 0,05$). Через 6 мес после завершения второго курса терапии интенсивности антигенспецифического ответа у больных сохранялась на высоком уровне и соответствовала уровню ответа после первого курса ИТ. Кроме того отмечалось дальнейшее возрастание митоген-стимулированного ответа до среднего уровня митогенной реактивности у здоровых доноров (59240 ± 3990 имп/мин).

Табл. 6 Динамика пролиферативного ответа МНК больных на HSV1gD антиген и КонА

Обследование	Пролиферативная активность (имп/мин)		
	МНК	МНК+ АГ	МНК+ КонА
До лечения	198 ± 44	208 ± 44 ($1,1 \pm 0,23$)	12314 ± 1840 ($58,4 \pm 8,9$)
После 1 курса ИТ	167 ± 45	932 ± 280 * ($5,2 \pm 2,3$)	16444 ± 2861 ($112 \pm 24,6$)
После 2 курса ИТ	150 ± 27	598 ± 222 * ($3,8 \pm 1,6$)	25979 ± 4453 * (186 ± 36)
Через 6 мес. после ИТ	208 ± 43	1196 ± 552 * ($5,4 \pm 2,8$)	64450 ± 18050 * (306 ± 59)

Примечание: данные представлены в виде $M \pm SE$ пролиферативного ответа МНК больных герпесвирусной инфекцией в отсутствие и в присутствии АГ или КонА. В скобках – индекс влияния ИВ_{АГ} и ИВ_{Кон-А} – отношение стимулированного ответа к уровню спонтанной пролиферации, * - достоверность различий по сравнению с показателями до лечения, $p < 0,05$, χ^2 -критерий Вилкоксона-Манна-Уитни

Судя по полученным данным, специфическая ИТ на основе ДК-вакцин в сочетании с использованием Ронколейкина в качестве адьюванта, позволяет уменьшить число рецидивов и выраженность их проявлений, а также увеличить продолжительность безрецидивного периода, что сопряжено с активацией специфического и неспецифического иммунного ответа.

ВЫВОДЫ

1. Больные хроническими инфекционными заболеваниями характеризуются количественным дефицитом активированных CD56⁺CD16⁺NK-клеток, повышенным содержанием регуляторных Т-клеток (CD4⁺CD25^{high} Treg, CD4⁺FoxP3 Treg), сдвигом Th1→Th2 баланса в сторону Th2-клеток, секретирующих ИЛ-4, а также повышенной активностью Т-клеток, секретирующих ИЛ-10, что свидетельствует о выраженных иммунных нарушениях, которые развиваются на фоне количественной экспансии регуляторных супрессорных Т-клеток и являются патогенетической основой персистенции и хронизации инфекции.

2. Дисбаланс Th1/Th2 (INF- γ /IL-4) и про-/противовоспалительных (TNF- α /IL-10) цитокинов регистрируется у пациентов с хроническими рецидивирующими инфекциями независимо от природы этиопатогена.
3. Th1-лимфоциты больных способны в ответ на стимуляцию активно продуцировать INF- γ , что указывает на принципиальную возможность коррекции Th1/Th2 баланса, и научно обосновывает клиническое применение rIL-2 (препарата «Ронколейкин») в лечении хронических рецидивирующих инфекций.
4. Трехкратное введение rIL-2 в суммарной дозе 1,5 мг в виде подкожных инъекций или ингаляций сопровождается усилением активности Th1-лимфоцитов и снижением уровня продукции IL-10 in vitro, и при этом не приводит к развитию побочных, иммуотропных эффектов, связанных с количественной экспансией регуляторных супрессорных Т-клеток.
5. Монотерапия препаратом rIL-2 позволяет в 65,6% случаев достичь клинически значимого позитивного ответа, который проявляется уменьшением частоты рецидивов, площади поражения и выраженности клинических проявлений, и 4-кратным увеличением длительности безрецидивного периода. При этом ингаляционный режим цитокинотерапии не уступает по своей эффективности традиционному, подкожному варианту введения препарата rIL-2 (70 и 60% позитивного ответа, соответственно), и позволяет статистически более значимо увеличить продолжительность ремиссии основного заболевания.
6. Относительное количество в периферической крови больных CD4⁺CD25^{high}T-reg является высокоинформативным и диагностически значимым предиктором клинического ответа на цитокинотерапию препаратом rIL-2. Исходно повышенное (>2,0%) содержание CD4⁺CD25^{high}T-reg позволяет с 84,6% специфичностью и 71,4% чувствительностью прогнозировать неэффективность монотерапии rIL-2 (ДК= 6,7, RR= 13,7).
7. Курсовое лечение больных с рецидивирующей герпетической инфекцией дендритноклеточными вакцинами в сочетании с адьювантной цитокинотерапией rIL-2 сопровождается индукцией антиген-специфического иммунного ответа, что позволяет уменьшить число и выраженность рецидивов без применения противовирусных препаратов.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Желтова О. И., Старостина Н. М., Тихонова М. А., Леплина О. Ю., Черных Е. Р., Останин А. А. Особенности иммунитета больных с хроническими рецидивирующими инфекциями. // Иммунология. – 2011. № 4. – С. 205-209.
2. Желтова О.И., Старостина Н.М., Тихонова М.А., Леплина О.Ю., Черных Е.Р., Останин А.А. Эффективность ронколейкина® в лечении хронических рецидивирующих инфекций. // Медицинская иммунология. – 2011. -№ 2-3. – С. 227-236.
3. Желтова О.И., Старостина Н.М., Останин А.А. Клиническая эффективность ронколейкина у пациентов с рецидивирующими инфекциями. // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2011. - № 2/2 (35). – С. 20-21.
4. Леплина О.Ю., Желтова О.И., Борисова А.Е., Старостина Н.М., Останин А.А. Вакцины на основе дендритных клеток в лечении герпетической инфекции. // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2011. - № 2/2 (35). – С. 38-39.
5. Желтова О.И., Старостина Н.М., Тихонова М.А., Курганова Е.В., Леплина О.Ю., Черных Е.Р., Останин А.А. Особенности иммунопатогенеза рецидивирующих инфекций у часто и длительно болеющих пациентов. // Материалы всероссийской научной конференции «Молекулярно-генетические основы функционирования цитокиновой сети в норме и при патологии». Цитокины и воспаления. – 2010. – Т. 9. - № 3. – С. 64-65
6. О.И. Желтова, Н.М. Старостина, М.А. Тихонова, О.Ю. Леплина, Е.Р. Черных, А.А. Останин. Эффективности Ронколейкина при различных режимах введения у часто и длительно болеющих пациентов с бактериальной или вирусной инфекцией. // Материалы юбилейной конференции «Клиническая иммунология и иммуногенетика – междисциплинарные проблемы», Ташкент 2010, С. 45.
7. Желтова О.И., Старостина Н.М., Леплина О.Ю., Тихонова Е.Я., Черных Е.Р., Останин А.А., Козлов В.А. Ронколейкин в лечении часто и длительно болеющих пациентов: предварительные результаты клинических испытаний (материалы конференции «Дни иммунологии в Сибири») Красноярск 2010, С. 234-236.
8. Желтова О.И., Леплина О.Ю., Старостина Н.М., Борисова А.Е., Останин А.А., Черных Е.Р. Специфическая иммунотерапия с использованием «интерфероновых» дендритных клеток в лечении рецидивирующей герпетической инфекции. // Материалы конференции «Дни иммунологии в Сибири», Красноярск 2010, С. 236-238.
9. Желтова О.И., Старостина Н.М., Черных Е.Р., Останин А.А. Иммунные нарушения при хронических рецидивирующих инфекциях и возможности их коррекции. // Материалы конференции «Дни иммунологии в Сибири», Абакан 2011, С. 196-198.
10. Желтова О.И., Старостина Н.М., Черных Е.Р., Останин А.А. Иммунные нарушения и их коррекция рекомбинантным интерлейкином-2 у больных с рецидивирующими инфекциями. // Материалы 8-й отчетной конференции НИИКИ СО РАМН «Иммунопатогенез и иммунотерапия основных заболеваний человека: от эксперимента к клинике», Новосибирск 2011, С. 117-118.

Подписано к печати 15.11.2011
формат - 60x84 1/16, Усл. печ. л. 1

Бумага: офсетная Печать: трафаретная
Тираж: 100 экз. Номер заказа № 467
Типография ООО "ЮГУС-ПРИНТ", ИНН 5402467637,
г. Новосибирск, ул. Залесского, 4