

## **ПРИНЦИПЫ ПРОТИВОВИРУСНОЙ И ИММУНОТЕРАПИИ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ**

Современные технологии лечения цитомегаловирусной инфекции базируются на следующих направлениях: применение противовирусных препаратов с расширением их спектра в клинической практике (ганцикловир, фоскарнет, ацикловир, валтрекс, фамцикловир); определение роли и места иммунотропной терапии в лечении; реабилитация детей и разработка схем комбинированной терапии (противовирусной и иммунотропной).

### ***Применение ронколейкина в терапии цитомегаловирусной инфекции у детей.***

Ронколейкин – инъекционная лекарственная форма рекомбинантного интерлейкина-2 человека. Отечественный препарат разработан фирмой BIOTECH (директор – академик биотехнологической Академии России М.Н. Смирнов). Активная субстанция Ронколейкина представлены рекомбинантным дрожжевым интерлейкином-2 человека, который является полипептидом и состоит из 133 аминокислот с молекулярным весом 15,4 кДа. Препарат получают методами современной белковой химии из клеток продуцента, которым является рекомбинантный штамм непатогенных пекарских дрожжей вида *Saccharomyces cerevisia*, в генетический аппарат которого встроен ген человеческого ИЛ-2. В качестве наполнителей использованы додецилсульфат натрия (солубизатор) и D-маннит (стабилизатор).

ИЛ-2 продуцируется субпопуляцией Т-лимфоцитов (Тхелперы I) в ответ на антигенную стимуляцию. Синтезированный ИЛ-2 воздействует на Т-лимфоциты, усиливая их пролиферацию и последующий синтез интерлейкина-2. ИЛ-2 направленно влияет на рост, дифференцировку и активацию Т- и В-лимфоцитов, моноцитов, макрофагов, олигодендроглиальных клеток и эпидермальных клеток Лангерганса. ИЛ-2 стимулирует цитолитическую активность натуральных киллеров и цитотоксических Т-лимфоцитов, представляющих важную роль в противоцитомегаловирусной защите организма.

Расширение спектра лизирующего действия эффекторных клеток обуславливает элиминацию патогенных микроорганизмов и инфицированных клеток. Биологические эффекты ИЛ-2 опосредуются его связыванием со специфическими рецепторами, представленными на различных клеточных мишенях.

Ронколейкин обладает выраженной иммуностимулирующей активностью, направленной на усиление противовирусного, противобактериального и противоопухолевого иммунитета и находит широкое применение в иммунотерапии септических, инфекционных и онкологических заболеваний человека, связанных с иммунодефицитом [21].

Ронколейкин апробирован в терапии цитомегаловирусной инфекции у 15 детей в возрасте от 1,2 мес. до 1 года. Препарат вводился в дозе 250000 ЕД подкожно, по схеме через два дня на третий, курс составил 4 инъекции. Клинический осмотр пациентов и мониторинг за эффектом терапии выполнены перед лечением, при каждой постановке инъекции, после окончания курса терапии через 1 месяц. Дети осмотрены невропатологом с проведением нейросонографического исследования на УЗИ аппарате «Aloka SSD-1700». Антитела классов IgM, IgG к цитомегаловирусу выявляли иммуноферментным методом (ИФА) с помощью тест-систем фирмы «Вектор-Бест» (г. Новосибирск) на аппарате «StatFax 300+». Индикацию ДНК-цитомегаловируса методом цепной полимеразной реакции (ПЦР) в крови и моче до начала лечения и через 2–4 дня после окончания курса терапии выполняли наборами «АмплиСенс-ЦМВ» (г. Москва) на аппарате «Терцик МС2». Исследование уровня цитокинов в сыворотке крови проводили до начала лечения и через 2–4 дня после курса ронколейкина наборами ООО «Прокон» (г. Санкт-Петербург) на аппарате «StatFax 300+», с определением IL2, IL6, IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , TNF.

Иммунологические исследования выполняли до начала лечения и через 2–4 дня после окончания терапии с оценкой поверхностных структур лимфоцитов методом иммунофенотипирования с применением моноклональных антител к фенотипическим маркерам лимфоцитов – CD3, CD4, CD8, CD19, CD16/56-анти-

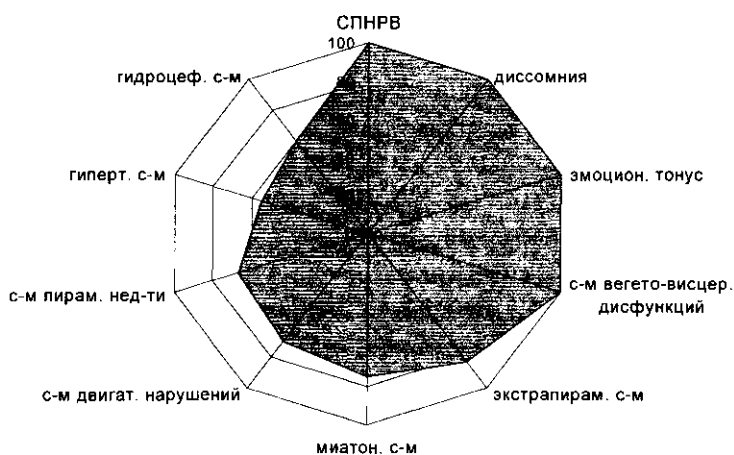
генам на проточном цитометре Becton Dickinson. Уровень иммуноглобулинов IgM, IgG, IgA изучали методом радиальной иммунодиффузии в агаровом геле, предложенный G. Mancini et al. (1965), содержание циркулирующих иммунных комплексов методом преципитации в растворе полиэтиленгликоля (ПЭГ-6000) по V.Naskova в модификации Ю.А. Гришечевич (1981). Результаты оценивали в единицах экстинции. Определение уровня комплементарной активности сыворотки крови проводили методом титрования по 50% гемолизу эритроцитов барана [Л.С. Резникова, 1967]. Результаты оценивали в условных единицах гемолитической активности.

Изучение окислительно-восстановительных процессов нейтрофилов выполняли с помощью реакции восстановления нитросинего тетразолия [А.Н. Маянский, 1981]. Для оценки поглощательной и переваривающей функции сегментоядерных нейтрофилов использовали метод изучения фагоцитоза по Берману В.М. – Славской Е.М. в модификации Олейниковой Е.А. [Олейникова Е.А., Эберт Л.Я., 1981] с оценкой активности фагоцитоза (АФ), фагоцитарного индекса (ФИ), фагоцитарного числа (ФЧ), завершенности (ЗФ) и эффективности (ЭФ) фагоцитоза.

Цитомегаловирусная инфекция у детей подтверждена определением ДНК-цитомегаловируса в крови и/или моче методом ПЦР. Специфические иммуноглобулины М к цитомегаловирусу не выявлены. Специфические анти-ЦМВ IgG до начала терапии были положительными у 60% детей, из них у 55% после окончания лечения IgG стали отрицательными и снижение титра антител в 2–8 раз отмечено у 22% детей. Одновременно наблюдалась отрицательная динамика в виде нарастания титра IgG в 2 раза у 11% детей, отсутствие сдвигов в уровне антител зарегистрировано у 11%, обнаружение позитивного результата анти-ЦМВ IgG после терапии установлено у 13% пациентов при отрицательном результате до начала терапии.

До начала терапии рошколейкином ДНК-ЦМВ в крови методом ПЦР определено у 47% обследованных, в моче – у 73%, в моче и крови одновременно – у 20% детей. После курса терапии рошколейкином наблюдалось подавление репликации вируса и

ДНК-ЦМВ в крови методом ПЦР у всех детей (100%). После окончания терапии ронколейкином исчезновение ДНК-ЦМВ в моче методом ПЦР установлено у 27% детей, индикация ДНК-ЦМВ сохранялась без динамики – у 47% и появление положительного результата после курса лечения прослежено у 7% пациентов. Клинически после курса иммунотерапии ронколейкином в неврологическом статусе отмечена положительная динамика в виде уменьшения проявлений синдрома пирамидной недостаточности у 67%, миотонического синдрома у 25%, синдрома нервно-рефлекторной возбудимости у 100%, синдрома двигательных нарушений у 70%, синдрома вегето-висцеральных дисфункций у 100%, диссомнии у 100%, улучшение эмоционального тонуса у 100% детей. Положительная динамика по экстрапирамидному синдрому выявлена у 83% детей, из них - нивелирование данного синдрома отмечено у 33% и уменьшение проявлений у 50% детей (рис. 4).



**Рис. 4. Частота купирования неврологических синдромов у детей с врожденной цитомегаловирусной инфекцией после терапии ронколейкином**

Назначение препарата у ребенка с тяжелой генерализованной формой цитомегаловирусной инфекции привело к снижению частоты эпилепсических приступов и восстановлению частоты через 2 недели после окончания терапии, у одного ребенка выявлено стойкое урежение частоты приступов.

Клинически уменьшение гепатомегалии выявлено у 87% детей, спленомегалии у 100%. Анемия I степени у 43% детей после окончания терапии сохранялась без динамики.

Показатели гемограммы, иммунного профиля и уровня цитокинов у детей с цитомегаловирусной инфекцией на фоне терапии ронколейкином при контрольном исследовании параметров через 2–4 дня после окончания лечения представлены в таблице 8. Контрольную группу по уровню цитокинов составили 17 здоровых детей в возрасте до 1 года.

Имунофенотипирование лимфоцитов и их субпопуляций у детей с цитомегаловирусной инфекцией до назначения терапии показало снижение содержания CD19-, CD4-лимфоцитов. В гуморальном звене иммунитета наблюдалось снижение продукции иммуноглобулинов IgA, селективный дефицит  $IgA \leq 0,01$  г/л отмечен у 27% детей.

После курса терапии ронколейкином выявлено повышение содержания в крови лейкоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов, NK-клеток по сравнению с группой здоровых детей (табл. 8). В гуморальном звене иммунитета сохранялось снижение продукции иммуноглобулинов IgA и селективный дефицит  $IgA \leq 0,01$  г/л – у 33% детей.

Мониторирование уровня  $IFN\alpha$  в сыворотке крови детей с цитомегаловирусной инфекцией, получавших ронколейкин, показало более высокие значения его содержания по сравнению с показателями в группе здоровых детей. Данную закономерность подтверждает увеличение показателей  $IFN\alpha$  после применения ронколейкина у 42% детей по сравнению с исходными данными, регистрируемыми у 8% детей ( $p < 0,05$ ).

При использовании непараметрических методов статистики (U-критерий Манна-Уитни) нами установлено повышение уровня IL-6 через 2–4 дня после окончания лечения ронколейкином

( $p < 0,05$ ). Оценка стартовых показателей цитокинов показала снижение содержания IL-6 у 50% пациентов с генерализованной формой цитомегаловирусной инфекции до начала иммунотерапии ронколейкином.

После назначения ронколейкина курсом № 4 подкожно, с интервалом в 2 дня у 100% детей отмечено восстановление уровня IL-6 до показателей контрольной группы ( $p < 0,02$ ).

Изучение корреляционных взаимосвязей показателей иммунофенотипирования лимфоцитов с уровнем содержания цитокинов при врожденной цитомегаловирусной инфекции у детей до начала иммунотерапии ронколейкином выявило наличие корреляций между популяцией CD4-лимфоцитов, реализующих Th1-ответ, и IFN $\gamma$  ( $r = 0,5442$ ,  $p < 0,05$ ), репликацией ДНК-ЦМВ ПЦР мочи и IFN $\gamma$  ( $r = -0,7058$ ,  $p < 0,01$ ), CD3-лимфоцитами и продукцией IL-6 ( $r = -0,5473$ ,  $p < 0,05$ ).

Характеризуя гуморальное звено иммунитета отмечены кооперативные взаимосвязи между популяцией CD19-клеток и CD3-лимфоцитами ( $r = 0,4967$ ,  $p < 0,05$ ). Об участии IL-2 в антителообразовании косвенно свидетельствует наличие корреляции показателя IL-2 с продукцией IgG ( $r = 0,5566$ ,  $p < 0,05$ ) и IgM ( $r = 0,8589$ ,  $p < 0,001$ ).

Прослежена отчетливая взаимосвязь между уровнем TNF в сыворотке крови больных детей и содержанием специфических IgG к ЦМВ-вирусу ( $r = 0,6722$ ,  $p < 0,01$ ).

После курса иммунотерапии ронколейкином отмечена активация цитотоксических CD8-лимфоцитов у 27% больных, косвенно подтвержденная появлением взаимосвязей CD8 цитотоксических лимфоцитов с IFN $\gamma$  ( $r = 0,5690$ ,  $p < 0,05$ ) и TNF ( $r = 0,5907$ ,  $p < 0,05$ ), что свидетельствует об активации Т-эффекторного звена иммунитета.

Известно, что основными продуцентами IFN $\gamma$  являются Th1, CD8-цитотоксические лимфоциты и NK-клетки [Хаитов Р.М., 2002]. Введение IL-2 сопровождалось появлением корреляций между IFN $\alpha$  и CD3-лимфоцитами ( $r = -0,5670$ ,  $p < 0,05$ ), IFN $\alpha$  и популяцией CD4-клеток ( $r = -0,6511$ ,  $p < 0,02$ ). Основными клетками, продуцирующими IFN $\alpha$  считают макрофаги и В-лимфо-

**Таблица 8**  
**Оценка иммунологических показателей и уровня цитокинов при назначении ронколейкина (n=15)**

Показатели	Здоровые люди		До лечения		P1	После лечения		P2	P3
	M	m	M	m		M	m		
Лейкоциты 10 <sup>9</sup> /л	9,0	± 0,29	9,49	± 0,9	>0,05	11,15	± 0,83	<0,02	>0,05
Нейтрофилы 10 <sup>9</sup> /л	2,15	± 0,14	2,38	± 0,3	>0,05	3,12	± 0,43	<0,05	>0,05
Лимфоциты 10 <sup>9</sup> /л	6,11	± 0,2	6,92	± 0,69	>0,05	7,6	± 0,6	<0,02	>0,05
Моноциты 10 <sup>9</sup> /л	0,46	± 0,05	0,4	± 0,07	>0,05	0,34	± 0,06	>0,05	>0,05
CD3 10 <sup>9</sup> /л	5,02	± 0,4	4,28	± 0,43	>0,05	4,62	± 0,41	>0,05	>0,05
CD19 10 <sup>9</sup> /л	2,26	± 0,21	1,46	± 0,11	<0,001	1,61	± 0,18	<0,05	>0,05
CD4 10 <sup>9</sup> /л	3,6	± 0,29	2,8	± 0,07	<0,01	3,14	± 0,29	>0,05	>0,05
CD8 10 <sup>9</sup> /л	1,32	± 0,16	1,07	± 0,16	>0,05	1,16	± 0,12	>0,05	>0,05
NK 10 <sup>9</sup> /л	0,57	± 0,08	1,0	± 0,23	>0,05	1,00	± 0,16	<0,02	>0,05
НСТ %	14,0	± 3,84	16,9	± 2,34	>0,05	16,7	± 2,13	>0,05	>0,05
IgG г/л	3,11	± 0,72	4,59	± 0,49	>0,05	4,06	± 0,59	>0,05	>0,05
IgM г/л	0,87	± 0,24	0,93	± 0,18	>0,05	1,07	± 0,21	>0,05	>0,05
IgA г/л	0,52	± 0,08	0,22	± 0,04	<0,001	0,19	± 0,02	<0,001	>0,05
ЦИК ед.оп.лп.	42,2	± 7,9	32,2	± 16,2	>0,05	37,87	± 13,3	>0,05	>0,05
СН <sub>50</sub> ед.	54,2	± 1,9	59,59	± 1,42	>0,05	56,9	± 1,05	>0,05	>0,05
IL2 пг/мл	118,8	± 26,7	67,0	± 20,2	>0,05	114,0	± 32,3	>0,05	>0,05
IL6 пг/мл	41,8	± 13,03	56,4	± 21,5	>0,05	157,2	± 59,13	>0,05	>0,05
IFNα пг/мл	0		0,33	± 0,33	>0,05	3,25	± 1,55	<0,05	>0,05
IFNγ пг/мл	194,86	± 25,44	183,6	± 50,9	>0,05	141,17	± 16,8	>0,05	>0,05
TNF пг/мл	21,0	± 5,7	60,5	± 43,3	>0,05	67,67	± 47,1	>0,05	>0,05

циты. Под влиянием ронколейкина увеличивается продукция противовоспалительных цитокинов, в частности IL-6, и появляются новые взаимосвязи между IL-6 и продукцией IgG ( $r=0,8549$ ,  $p<0,001$ ), IL-6 и IgM ( $r=0,8456$ ,  $p<0,001$ ), маркером раннего неспецифического ответа  $IFN\alpha$  и эффекторными клетками.

Клинико-иммунологическую эффективность применения ронколейкина доказывает подавление репликации цитомегаловируса в крови у всех больных, получивших иммунотерапию.

Таким образом, резюмируя результаты клинической апробации препарата ронколейкин в разовой дозе 250000 ЕД (курсовая доза 1 млн. ЕД) у детей раннего возраста с генерализованной формой цитомегаловирусной инфекции при подкожном назначении с интервалом в 2 дня №4 нами получен у большинства пациентов отличный (20%) и хороший (53%) клинический эффект. При этом следует отметить, что у 27% детей достигнут только удовлетворительный результат.