

СИСТЕМНОЕ И ЛОКАЛЬНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИТОКИНОВ И ИММУНОКОРРЕКЦИЯ СУПЕРЛИМФОМ У БОЛЬНЫХ РЕЦИДИВИРУЩИМ ГЕНИТАЛЬНЫМ ГЕРПЕСОМ

Л.В. Ковальчук, О.В. Козырева,
Е.В. Матушевская, Л.В. Ганковская

Кафедра кожных и венерических болезней лечебного факультета
ГОУ ВПО РГМУ Росздрава

(зав. кафедрой – акад. РАМН проф. Ю.К. Скрипкин)

Кафедра иммунологии ГОУ ВПО РГМУ Росздрава
(зав. кафедрой – акад. РАЕН проф. Л.В. Ковальчук)

Герпетическая инфекция (ГИ) является одним из наиболее распространенных латентно протекающих вирусных заболеваний человека, характеризующихся многообразием клинических проявлений. Одной из форм, вызываемых вирусом простого герпеса (ВПГ), является генитальный герпес (ГГ), занимающий, по данным ВОЗ, по распространенности третье место среди инфекций, передающихся половым путем. В настоящее время генитальный герпес представляет собой важную медицинскую и социальную проблему [4]. Определяющая роль в развитии и течении ГИ отводится специальному клеточно-опосредованному иммунитету [2].

В основе патогенеза ГИ лежат нарушения иммунной системы, в частности, снижение активности различных клеточных элементов и изменения цитокинового статуса [12]. У больных с тяжелым течением ГИ, как правило, наблюдается угнетение клеточного иммунитета, незавершенность фагоцитоза, преобладание зрелых форм вируса [3,8].

Цитокины интерлейкин-12 (ИЛ-12) и интерферон (ИФ) играют значительную роль в противовирусной защите организма больных рецидивирующими генитальными герпесами [9,11]. Известно, что уже в первые часы после инвазии вируса простого герпеса I и II типов клетки макрофагального ряда начинают вырабатывать ИФα и ФНОα, активирующие систему фагоцитарных клеток. Затем макрофаги продуцируют ИЛ-12, который, наряду с вышеупомянуты-

ми цитокинами, стимулирует другие клетки, особенно NK-клетки, к выработке ИФγ и к активации макрофагов. Также ИЛ-12 способствует дифференцировке наивных Т-хелперов в Т-хелперы I типа, продуцирующие ИФγ, и регулирует деятельность цитотоксических Т-лимфоцитов [6].

Целью исследования являлось определение содержания цитокинов ИЛ-12 и ИФγ на системном и локальном уровнях, а также сравнительный анализ концентрации этих цитокинов до и после проведения цитотерапии препаратом *суперлимф* у больных рецидивирующими генитальными герпесами.

Материалы и методы исследования. Исследование проводилось у 36 больных (24 мужчины и 12 женщин) рецидивирующими генитальными герпесами (РГГ).

Определение цитокинов ИЛ-12 и ИФγ осуществлялось при помощи тест-систем фирмы «BioSource International», основанных на методе твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Исследуемым материалом являлась сыворотка больных, а также соскоб эпителия из уретры. Исследования проводились в начале обострения и после проведенного лечения. В качестве контроля была набрана группа здоровых добровольцев. Забор крови у больных ГГ проводился из вены в количестве 10 мл, затем из нее получали сыворотку, которую в свою очередь распределяли в три пробирки Эпнендорфа и замораживали. Соскобы из уретры и содержимое пузырьков получали с помощью стерильных одноразовых зондов (зонд универсальный ЗГ

Бу-«ЦМ+» для взятия материала из цервикального канала и уретры), которые помещали в специальную полипропиленовую пробирку Эппендорфа объемом 1,5 мл в 100 мкл стерильного физиологического раствора и замораживали для дальнейшего хранения в течение месяца.

В сыворотке крови 36 больных РГГ в стадии обострения и 12 здоровых доноров определено содержание цитокинов ИЛ-12 и ИФ γ . Также было изучено содержание данных цитокинов в выделениях из уретры больных РГГ (14 человек) и здоровых мужчин (5 человек).

Иммунокорригирующую терапию проводили препаратом *суперлимф*, представляющим собой сбалансированный комплекс с активностью ряда цитокинов: интерлейкинов-1,3,6, фактора некроза опухоли (ФНО), миграцию ингибирующего фактора (МИФ), трансформирующих факторов роста ТФР β_1 и ТФР β_2 и противомикробных протегринподобных пептидов. *Суперлимф* назначали в качестве монотерапии по следующей схеме: суппозитории (25 ЕД) ректально на ночь ежедневно в течение 10 дней. Одновременно *суперлимф* применяли наружно в виде аппликаций на высыпания и эрозии 5 раз в день в течение 5–7 дней. Пациенты в группе сравнения получали лечение препаратом *ацикловир* (200 мг 5 раз в день в течение 5–10 дней). Кроме того, использовалась комплексная терапия, включающая препараты *суперлимф* (по представленной выше схеме) и *ацикловир*, который назначался по 200 мг 5 раз в день в течение 5–10 дней.

Результаты исследования. Концентрация ИЛ-12 в сыворотке крови здоровых доноров составила 534 ± 82 пг/мл, а в сыворотке больных ГГ – 187 ± 53 пг/мл ($p < 0,05$). ИФ γ выявлялся в сыворотке в незначительной концентрации: 4 ± 3 пг/мл у здоровых доноров и 9 ± 7 пг/мл – у больных ГГ, без статистически достоверных отличий. В то же время необходимо отметить, что ИЛ-12 выявлялся в сыворотке 100% обследованных доноров и больных, в то время как ИФ γ только у 20% обследованных здоровых доноров и у 80% больных ГГ.

Известно, что во многих случаях определение цитокинов в биологических жидкостях более информативно по сравнению с их определением в сыворотке. В частности, при развитии локального воспалительного процесса или при нарушении механизмов тканевой регенерации отсутствуют выраженные изменения в системном иммунном ответе [10,13].

В связи с этим нами изучено содержание данных цитокинов в выделениях из уретры больных РГГ. Содержание ИЛ-12 в выделениях из уретры больных герпесом возрастает по сравнению со здоровыми людьми примерно в 5 раз (32 ± 8 пг/мл и 6 ± 4 пг/мл соответственно). При исследовании содержания ИФ γ в выделениях из уретры больных РГГ обнаружено значительное увеличение содержания данного цитокина (более чем в 9 раз) по сравнению со здоровыми людьми (103 ± 23 пг/мл и 11 ± 2 пг/мл соответственно).

Обобщая полученные результаты можно отметить, что, по всей видимости, исследование цитокинов на локальном уровне является действительно более информативным при данной патологии. Однако определение цитокинов в сыворотке крови также может являться полезным для уточнения патогенеза заболевания.

В связи с тем, что нами был установлен факт изменения уровней исследуемых цитокинов ИЛ-12 и ИФ γ у больных РГГ, включение в терапию таких больных иммунотропного препарата *суперлимф* представляется патогенетически обоснованным. В литературе имеются данные, демонстрирующие влияние препарата на продукцию цитокинов различными клетками иммунной системы *in vitro* [1].

При проведении специфической противовирусной терапии и иммунокоррекции все пациенты, включенные в исследование, рандомизированы на три группы методом случайной выборки и равномерно распределены по возрасту, полу, продолжительности и тяжести заболевания.

В первую группу (1) включены 12 пациентов, которые получали лечение препа-

ратом суперлимф. Пациенты второй группы (2) в количестве 10 человек принимали ацикловир. Третья группа (3) – 14 пациентов – получала комплексное лечение препаратами ацикловир и суперлимфом. Как видно на рис. 1, только у больных, получавших комплексную терапию ацикловиром и суперлимфом, происходит статистически достоверное увеличение концентрации ИЛ-12 в сыворотке крови (174 ± 35 пг/мл до лечения и 267 ± 53 пг/мл после лечения), не достигая, однако, уровня здоровых людей – 534 ± 82 пг/мл. Концентрация ИФ γ в сыворотке больных всех трех групп достоверно не отличалась до и после лечения.

На следующем этапе исследования мы оценивали локальные уровни цитокинов в выделениях из уретры до и после лечения. Наиболее выраженный клинический эффект получен при комплексном лечении ацикловиром и суперлимфом. У больных этой группы также обнаружены значимые изменения концентрации цитокинов в сыворотке крови. Исследование уровня цитокинов в выделениях из уретры проводилось у 14 больных 3-й группы. После лечения происходит снижение локального уровня ИЛ-12 и ИФ γ , т.е. их содержание нормализовалось при сравнении с уровнями здоровых людей (рис. 2). Концентрация ИЛ-12 в выделениях из урет-

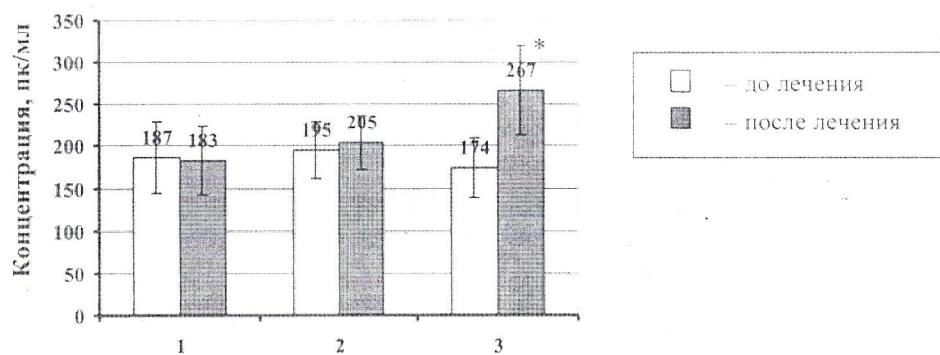


Рис. 1. Содержание ИЛ-12 в сыворотке периферической крови больных генитальным герпесом до и после цитокинотерапии: 1 – у больных, получавших монотерапию суперлимфом; 2 – у больных, получавших терапию ацикловиром; 3 – у больных, получавших комплексную терапию ацикловиром и суперлимфом; * – достоверные различия между группами по критерию Уилкоксона ($p < 0,05$).

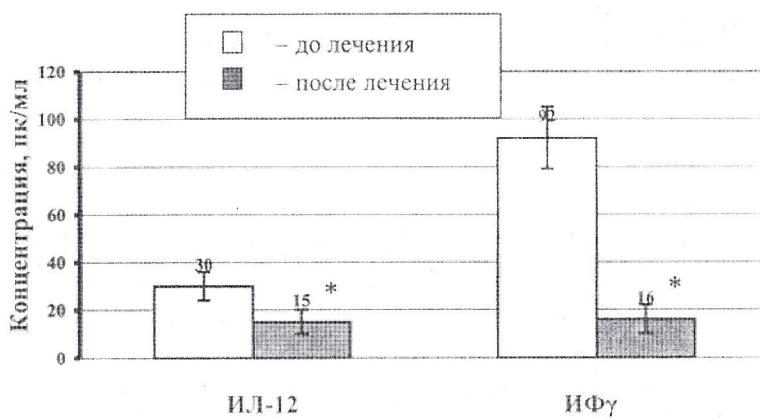


Рис. 2. Концентрация ИЛ-12 и ИФ γ в выделениях из уретры больных генитальным герпесом до и после лечения (ацикловир+суперлимф); * – достоверные различия между группами по критерию Уилкоксона ($p < 0,05$).

ры больных составляла 30 ± 6 пг/мл, после проведенной комплексной терапии снижалась до 15 ± 5 пг/мл. Этот показатель выше, чем у здоровых людей (6 ± 4 пг/мл). Содержание ИФ γ в выделениях из уретры у больных определялось на уровнях 92 ± 13 пг/мл до лечения и 16 ± 6 пг/мл после лечения, в то время как у здоровых людей данный показатель составлял 11 ± 2 пг/мл.

Обсуждение результатов. При исследовании уровня цитокинов ИЛ-12 и ИФ γ показано значительное снижение концентрации ИЛ-12 в сыворотке крови больных РГГ и увеличение частоты выявления ИФ γ . Ранее нами было показано, что в сыворотке здоровых людей концентрация ИФ γ составляет от 4 до 43 пг/мл, а частота встречаемости не превышает 20% [6].

Представляется перспективным изучение локального содержания цитокинов в биологических жидкостях, где в меньшей степени оказывается влияние системных факторов регуляции иммунитета со стороны нервной и эндокринной систем.

При исследовании уровней данных цитокинов в выделениях из уретры больных ГИ установлено, что в данном случае обнаруживаются более значимые изменения в выработке цитокинов, а именно: в 5 раз увеличивается содержание ИЛ-12 и более чем в 9 раз – ИФ γ . Определение цитокинов на локальном уровне более информативно. Следует отметить, что полученные нами данные об увеличении содержания ИФ γ в выделениях из уретры больных генитальным герпесом совпадают с данными Т.Н. Сумеди, также показавшей увеличение уровня ИФ γ в цервикальной слизи пациенток с урогенитальной инфекцией вирусной этиологии [7]. Таким образом, полученные данные еще раз подтверждают значимость ИФ γ в патогенезе РГГ на уровне слизистой.

Включение суперлимфа в терапевтическую схему РГГ обусловливается тем, что препарат оказывает прямое противовирусное действие, вызывая разрушение оболочки вирионов герпеса простого и снижение его инфекционного титра [1]. Кроме того,

противовирусный эффект суперлимфа обусловлен не только прямым ингибирующим действием препарата на репликацию вируса герпеса, но и опосредованным – через активацию цитотоксических клеток-эффекторов (макрофагов, естественных киллеров и др.), что также происходит в результате действия цитокинов [5].

Подводя итог проведенным исследованиям, можно отметить, что наиболее патогенетически значимые изменения уровней цитокинов получены нами при изучении их локального содержания, при этом терапевтическая эффективность комплексной схемы лечения, включающей в себя применение ацикловира с иммуномодулирующим препаратом суперлимф, коррелирует с нормализацией уровней цитокинов в выделениях из уретры.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баркевич О.А. Противовирусные эффекты комплекса природных цитокинов (препарат Суперлимф) на модели герпесвирусной инфекции *in vitro*. Автореф. дис. ... к.м.н. – М., 2005. – С. 20.
2. Галегов Г.А. // Consillium medicum. – 2002. – Т. 4. – №5. – С. 240–244.
3. Дубенский В.В. // Вестн. дермат. и венерол. – 2002. – №3. – С. 53–57.
4. Каримова И.М. Герпесвирусная инфекция. Диагностика, клиника, лечение. – М., 2004. – С. 46–47.
5. Ковальчук Л.В. и др. // Russian J. of Immunology. – 2005. – 9(2). – С. 37–42.
6. Ковальчук Л.В., Долгина Е.Н., Ганковская Л.В. и др. // Аллергол. и иммунол. – 2005. – Т.6. – №4. – С. 460–465.
7. Сумеди Т.Н. Содержание цитокинов в периферической крови и слизи цервикального канала у женщин с невынашиванием беременности инфекционного генеза. Автореф. дис. ... к.м.н. – М., 2005. – С. 22.
8. Халдин А.А. Иммунологическое обоснование дифференцированных

- подходов к терапии простого герпеса. Автореф. ... д.м.н. – М., 2000. – 47 с.
9. Aravalli R.N., Hu S., Rowen T.N. et al. // J. Immunol. – 2005. – Oct. 1. – V.175. – №7. – P. 4189–4193.
10. Duan Z.G., Yang W.M. // Zhonghua Nan Ke Xue. – 2005. – Mar. – V.11. – №3. – P. 201.
11. Parker J.N., Pfister L.A., Quenelle D. et al. // Vaccine. – 2006. – Mar. 6. – V.24. – №10. – P. 1644–1652.
12. Zanetti G. // Rev. Med. Suisse. – 2005 Jan. – 12. – 1(2). – P.134.
13. Zierhut M., Bieber T., Brocker E.B., Forrester J.V., Foster C.S., Streilein J.W. // Immunol. Today. – 1996 Oct. – V.17. – №10. – P. 448–450.

SYSTEMIC AND LOCAL DETERMINATION OF CYTOKINES AND IMMUNOCORRECTION WITH SUPERLYMPH IN PATIENTS WITH RECURRENT GENITAL HERPES

L.V.Kovalchuk, O.V.Kozyreva, E.V.Matushevskaya, L.V.Gankovskaya

Department of dermatovenerology of medical faculty, RSMU

Department of immunology, RSMU

There are shown the results of cytokine status explorations from 36 patients with recurrent genital herpes. Those data are the evidence of abnormalities in IL-12 and IFN-gamma blood serum and urethra discharge quantity. The study revealed the importance of IL-12 and IFN-gamma determination in urethra discharge. As a result of combined treatment of recurrent genital herpes including immunomodulator Superlymph and acyclovir normalized concentration of cytokines was observed.