

На правах рукописи

КЛЯУСОВ АНДРЕЙ СЕРГЕЕВИЧ

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИММУНОТРОПНОГО ДЕЙСТВИЯ
АНТИТЕЛ К CD-4 И ГАММА-ИНТЕРФЕРОНУ ЧЕЛОВЕКА
ПРИ ЛЕЧЕНИИ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ БОЛЬНЫХ С
АССОЦИИРОВАННЫМ ТУБЕРКУЛЕЗОМ**

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Волгоград - 2013

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель: заслуженный деятель науки РФ, академик РАМН, доктор медицинских наук, профессор
Петров Владимир Иванович

**Официальные
оппоненты:**

Умерова Аделя Равильевна
доктор медицинских наук, профессор,
Астраханской государственной медицинской академии, кафедры клинической фармакологии с курсом клинической аллергологии и фитотерапии, заведующая кафедрой

Смирнова Людмила Андреевна
доктор биологических наук, лаборатории фармакологической кинетики НИИ фармакологии Волгоградский государственный медицинский университет, заведующая лабораторией

Ведущая организация: Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «**Ростовский государственный медицинский университет**» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится "___" декабря 2013г. в __ часов на заседании диссертационного совета Д 208.008.02 при Волгоградском государственном медицинском университете по адресу: 400131, г. Волгоград, пл. Павших борцов, 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Волгоградского государственного медицинского университета.

Автореферат разослан "___" ноября 2013 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Бугаева Любовь Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень её разработанности

По данным ВОЗ, более 30% населения планеты инфицировано микобактериями туберкулеза, и ежегодно регистрируется до 8 миллионов новых случаев (WHO, 2012). При этом наличие вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) у больных туберкулёзом значительно ухудшает течение болезни и повышает вероятность смертельного исхода. Риск заражения туберкулёзом у ВИЧ-инфицированных лиц повышен более чем в 100 раз, что связано с взаимноотягощающим действием этих инфекций (Фролова О.П. и соавт., 2009).

Примерно каждый третий ВИЧ-положительный пациент умирает от ассоциированного туберкулёза (WHO, 2012). ВИЧ разрушает компоненты клеточного иммунитета, и, в первую очередь, CD4-лимфоциты. Эти клетки продуцируют гамма-интерферон, обеспечивающий адаптивный иммунный ответ первого типа, при котором происходит активация макрофагов и последующее уничтожение внутриклеточных бактерий. Именно этот механизм препятствует развитию туберкулёзной инфекции, а его дезактивация приводит к возникновению активных форм заболевания, а также внелёгочных проявлений и бессимптомных форм (Покровский В. В., 2010).

Помимо снижения возможности иммунной системы отвечать на микобактерии, ВИЧ увеличивает чувствительность к туберкулёзной инфекции и риск прогрессирования в активную фазу заболевания. При этом диагностика туберкулёза у лиц, инфицированных ВИЧ, часто запаздывает, что связано с атипичными клиническими проявлениями и присоединением других инфекций (Свистунова А.С. и соавт., 2005, Libman H., Makadon H., 2007).

В то же время, ранняя диагностика и подбор адекватной терапии позволяют успешно лечить туберкулёз у ВИЧ-инфицированных больных, что требует от пациентов строгой приверженности режиму приёма препаратов на протяжении многих месяцев. Однако на практике врачи сталкиваются с низкой комплаентностью больных, обусловленной употреблением психоактивных веществ на фоне терапии, сложностью режима приёма препаратов, страхом раскрытия диагноза в связи с общественными предрассудками, низким уровнем образования, плохим снабжением лекарственными препаратами. Решение данных проблем требует улучшения мер профилактики возникновения туберкулёза и социальной защищённости населения (Казенный А.Б., Полесский В.А., Фролова О.П., 2013).

Ещё одна особенность заключается в том, что противотуберкулёзные препараты могут взаимодействовать с антиретровирусными (АРВ) препаратами, приводя к возникновению тяжёлых побочных и токсических эффектов, что требует тщательного подбора индивидуальных схем терапии с использованием новых препаратов и технологий (Покровский В. В., 2010, Фролова О.П. и соавт., 2006, Clay J. Cockerell et al., 2011). Такой подход позволяет увеличить продолжительность жизни больных, улучшить качество

жизни, снизить вирусную нагрузку до минимального уровня, восстановить как количественные, так и качественные показатели функции иммунной системы.

Анализ исследований, проведенных за последнее десятилетие, показал, что в формировании противотуберкулезного иммунитета принимают активное участие Т-хелперы 1-го типа (Th1), секретируя интерлейкин-2 (IL-2), IL-12 и интерферон-гамма (ИФН- γ) (Poli G., 1993, Casanova JL, Abel L., 2002). ВИЧ, в свою очередь, приводит к уничтожению в большей степени именно Th1 клеток, тем самым, подавляя синтез цитокинов, увеличивает прогрессирование развития туберкулеза. Таким образом, активация клонов Т-хелперов первого типа, с последующим увеличением продукции зависимых цитокинов, является обоснованным и перспективным направлением в улучшении противотуберкулезной терапии ВИЧ-положительных пациентов.

С этих позиций интерес вызывает отечественный препарат, содержащий аффинно-очищенные антитела к CD4 и ИФН- γ человека (препарат зарегистрирован в МЗ РФ в качестве лекарственного средства, номер регистрационного удостоверения ЛСР-007378/10-300710 от 30.07.2010). Антитела к ИФН- γ повышают экспрессию интерферонов γ и в меньшей степени α/β , опосредованно увеличивают концентрацию IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, восстанавливают цитокиновый статус (Эпштейн О. И., Штарк М. Б. и соавт., 2005). Антитела к CD4, в свою очередь, повышают активность CD4-лимфоцитов, увеличивают их абсолютное количество, и, вследствие этого, общего количества CD3-клеток и нормализации иммунорегуляторного индекса CD4/CD8. Совместное применение этих антител приводит к повышению их иммуностропного влияния, прежде всего за счёт усиления интерферон-зависимой активации CD4-лимфоцитов (Эпштейн О. И., 2008). Это особенно важно в комплексном лечении ВИЧ-инфицированных больных, у которых крайне высок риск развития побочных эффектов лечения, связанный как с большим количеством препаратов, так и с общим ослаблением иммунитета, обусловленным присоединением сопутствующих заболеваний.

Таким образом, препарат на основе антител к CD4 и ИФН- γ человека, прямо или опосредованно воздействующий на основные звенья развития ВИЧ-инфекции и туберкулеза, представляется перспективным средством в комбинированной терапии ВИЧ-инфицированных больных с ассоциированным туберкулезом.

Цель и задачи исследования

Улучшение результатов лечения ВИЧ-инфицированных больных с ассоциированным туберкулезом путём применения препарата на основе антител к CD4 и интерферону-гамма человека и изучения его иммуностропных свойств.

Для реализации поставленной цели были обозначены следующие задачи:

1. Исследовать влияние препарата антител к CD4 и ИФН- γ человека на субпопуляции лимфоцитов крови ВИЧ-инфицированных больных как с туберкулезом, получающих противотуберкулезную терапию, так и без него, получающих антиретровирусную терапию.

2. Оценить изменения содержания интерферона-гамма, интерлейкинов-2, 4, 12 в крови ВИЧ-инфицированных больных с ассоциированным туберкулезом и без, получающих комбинированную терапию с препаратом на основе антител к CD4 и ИФН- γ человека.

3. Оценить влияние на вирусную нагрузку курсового приёма препарата на основе антител к CD4 и ИФН- γ человека у ВИЧ – инфицированных больных с ассоциированным туберкулезом и без него.

4. Оценить целесообразность включения препарата на основе антител к CD4 и ИФН- γ человека в состав комплексного лечения туберкулеза у ВИЧ – положительных пациентов в дополнение к противотуберкулёзной химиотерапии.

Научная новизна

1. Впервые оценены лабораторные показатели состояния иммунной системы у ВИЧ-инфицированных пациентов с туберкулезом на фоне применения препарата на основе антител к CD4 и ИФН- γ человека.

2. Впервые оценена эффективность влияния антител к CD4 и ИФН- γ на изменение профиля цитокинов у ВИЧ-положительных пациентов с ассоциированным туберкулёзом.

3. Впервые на основе лабораторных данных обоснована возможность применения антител к CD4 и ИФН- γ у ВИЧ-инфицированных больных с ассоциированным туберкулезом в фазу активной химиотерапии.

Теоретическая и практическая значимость работы

Наибольшее положительное влияние исследуемого препарата на функциональную активность иммунокомпетентных клеток было выявлено в группе ВИЧ-инфицированных с ассоциированным туберкулёзом легких. Полученные результаты могут быть использованы для последующей разработки и создания методических рекомендаций для профилактики и лечения инфильтративной формы туберкулёза легких у ВИЧ-положительных пациентов в период интенсивной химиотерапии, когда одновременное назначение АРВТ может осложняться тяжелыми побочными эффектами. Область показаний к применению исследуемого препарата может быть расширена включением профилактики и лечения вторичного туберкулёза при инфицировании вирусом иммунодефицита человека.

Результаты исследования включены в состав лекций и практических занятий на кафедре клинической фармакологии и интенсивной терапии с курсами клинической фармакологии ФУВ, клинической аллергологии ФУВ, на кафедре иммунологии и аллергологии и на кафедре инфекционных болезней с эпидемиологией и тропической медициной Волгоградского государственного медицинского университета.

Методология исследования

Дизайн исследования и полученные практические результаты согласуются с основными положениями и принципами доказательной медицины. Работа проводилась с соблюдением правил научных исследований и основывалась на принципах биоэтики.

Теоретической и методологической основой исследования послужили фундаментальные и прикладные исследования отечественных и зарубежных ученых по данной проблеме, публикации в периодических изданиях, методические рекомендации. Теоретический анализ обзора литературы подкреплялся экспериментальными лабораторными данными.

Положения, выносимые на защиту

1. Препарат на основе антител к CD4 и интерферону-гамма человека статистически значимо увеличивает абсолютный показатель клеток CD4.

2. При приеме препарата антител к CD4 и интерферону-гамма человека достоверно повышается секреция иммунорегуляторных цитокинов (IL-2, IL-4, ИФН- γ). Наиболее значимые изменения цитокинового профиля происходят у пациентов с ВИЧ и туберкулезом.

3. Исследуемый препарат увеличивает секрецию интерлейкина-12 у ВИЧ-инфицированных больных с туберкулезом, тем самым усиливая естественный антибактериальный ответ, формирующийся под влиянием интерферона-гамма и интерлейкина-12.

4. Исследуемый препарат препятствует проникновению вирусной РНК в клетки CD4 лимфоцитов и опосредованно через экспрессию регуляторных цитокинов подавляет репликацию вируса, что наиболее выражено и необходимо при химиотерапии туберкулеза у ВИЧ-положительных пациентов.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных в ходе исследования результатов достигалась за счет формирования однородности выборки участников, применения адекватных параметрических и непараметрических методов биostatистики, строгого соблюдения методик при постановке лабораторных тестов, анализа результатов, обоснования и согласованности проведенных ранее исследований с полученными экспериментальными данными.

По теме диссертации опубликовано 3 печатных работы, в том числе 1 в издании, рекомендованном Высшей Аттестационной Комиссией. Фрагменты работы были доложены на 71-ой открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (г. Волгоград, 24 - 27 апреля 2013).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Работа проводилась в период с 2010 по 2013 годы на базе ГУЗ «Волгоградский областной центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями» в соответствии с перспективным планом научно-исследовательских работ.

Проведение исследования одобрено на заседании Комиссии по экспертизе диссертационных исследований Регионального Независимого Этического Комитета (протокол №7-2010 от 12.10.2010г.). Утверждённый протокол исследования не содержал замечаний, изменений и дополнений.

Материалы и методы исследования

Характеристика групп больных, выбор сроков исследования.

Исследуемая группа состояла из 60 пациентов (возраст от 25 до 50 лет, 35 мужчин (58,3%) и 25 женщин (41,7%)) с верифицированным диагнозом ВИЧ-инфекции. Среди исследуемых пациентов 28 человек (16 мужчин и 12 женщин) с впервые диагностированным инфильтративным туберкулёзом лёгких без выделения микобактерий туберкулеза (БК-). Диагноз туберкулез подтверждался бактериоскопическими, бактериологическими и клинико-рентгенологическими исследованиями. В ходе исследования пациенты были разделены на 4 группы:

1 группа – ВИЧ-инфицированные лица без туберкулеза (ВИЧ), получающие антиретровирусную терапию (16 человек);

2 группа – ВИЧ-инфицированные лица без туберкулеза (ВИЧ), получающие антиретровирусную терапию в сочетании с курсовым приемом антител к CD4 и интерферону-гамма человека (16 человек);

3 группа – ВИЧ-инфицированные лица с туберкулёзом (ВИЧ/Тб), получающие только противотуберкулёзную химиотерапию (14 человек);

4 группа – ВИЧ-инфицированные лица с туберкулёзом (ВИЧ/Тб), получающие противотуберкулёзную химиотерапию в сочетании с курсовым приемом антител к CD4 и интерферону-гамма человека (14 человек);

В контрольную группу сравнения входили 20 здоровых доноров, сопоставимых по полу, возрасту, без хронических и острых заболеваний, перенесенных за последние 6 месяца, и без выявленного туберкулеза и ВИЧ.

Лечение всех пациентов осуществлялось в соответствии со стандартами терапии ВИЧ-инфекции и туберкулёза. Продолжительность исследования составляла 2,5 месяца. В этот период пациенты с туберкулёзом не принимали антиретровирусные препараты. Терапия туберкулёза осуществлялась в соответствии со стандартами лечения данного заболевания у ВИЧ-инфицированных больных. Схема лечения ВИЧ-инфекций включенных в исследование пациентов предполагала применение двух нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы (Зидовудин+Ламивудин) и одного ненуклеозидного ингибитора обратной транскриптазы (Эфавиренз). Комбинированная химиотерапия туберкулёза проводилась препаратами: изониазид, рифампицин, пипразинамид и этамбутол.

Иммунный статус оценивали, исследуя субпопуляционный состав периферической крови (CD3, CD4, CD8), цитокиновый статус (IL-2, IL-4, IL-12, INF- γ). Анализ биоматериала проводился перед началом исследования и через 2,5 месяца.

Подготовка проб крови. Кровь из вены брали утром натощак, до приема медикаментов, физиопроцедур в вакуумные пробирки с ЭДТА-К3 Green Vac-Tube (Green Cross, Корея).

Иммунофенотипирование лимфоцитов. Осуществлялось с помощью тест-систем FACSCoount Reagent Kit на проточном цитофлюориметром FACSCoount (Becton Dickinson, США). Тест системы содержали антитела, меченные флюорохромами FITC, PE, к CD3, CD4, CD8.

Определение количества IL-2, IL-4, IL-12. Для определения концентрации цитокинов использовались наборы тест-систем («Biosource», Invitrogen, США). Измерения проводили твердофазным иммуноферментным методом согласно прилагаемым протоколам.

Определение вирусной нагрузки. Количество копий вирусной РНК определяли с использованием наборов «Cobas Amplicor HIV-1 Monitor test, v1.5» для автоматического ПЦР-анализатора COBAS AMPLICOR Analyzer («Хоффманн-Ла Рош», Швейцария). Порог чувствительности - 50 копий/мл (уровень выявления 95%).

Статистическая обработка полученных результатов и построение графиков проводилось с использованием программных пакетов «Statistica 8.0» (StatSoft), «Excel 2007» (Microsoft). Критический уровень значимости (p) при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05 (5%). Достоверность различий между сравниваемыми показателями для независимых выборок определялась с помощью непараметрического U-критерий Манна-Уитни, а для зависимых выборок W критерий Уилкоксона для сравнения больных до и после лечения. Результаты представлены в виде медианы (Me), первого и третьего квартилей (Q1, Q3) (Me [Q1-Q3]).

Результаты исследования и их обсуждение

Для анализа однородности выборок после рандомизации, группы были сравнены между собой и с контрольной группой по основным показателям, используемым в исследовании.

Проведенное исследование клеточного звена иммунной системы показало, что уровень лимфоцитов CD3 до начала исследования во всех группах был достоверно ($p < 0,05$) снижен по сравнению с группой здоровых до начала исследования (рис. 1). Это обусловлено заметно низким уровнем CD4 на фоне повышенного содержания цитотоксических CD8.

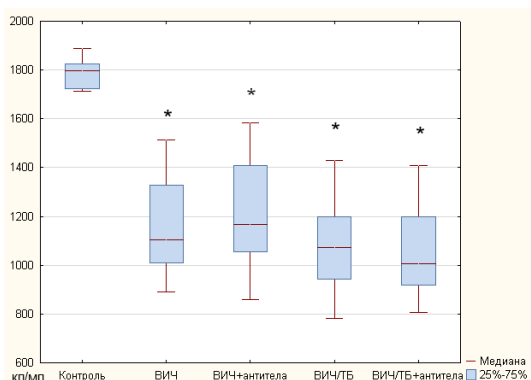


Рис 1. Содержание CD3 клеток в периферической крови пациентов до исследования Me [Q1-Q3].

Примечание: * - $p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни (отличия от контрольной группы)

В отношении Т-хелперов CD4 начальное их количество было в 2-3 раза ниже во всех группах ВИЧ-инфицированных ($p < 0,05$), чем в группе здоровых добровольцев (рис. 2). Особо низкое количество отмечалось в группах с туберкулёзом легких, что не противоречит литературным данным (Покровский В.В., 2010, Harries A.D., 2004, Espinal M.A. et al., 2000) и связано с ослаблением функциональной активности макрофагов. Недостаточная активация их Т-лимфоцитами приводит к невозможности завершить процесс фагоцитоза микобактерий. При этом количество микобактерий возрастает, что приводит к распространению по всей ткани легкого и инфицированию соседних клеток. Наименьшее содержание CD4-лимфоцитов в группе с туберкулёзом возможно связано с негативным влиянием как ВИЧ, так и туберкулеза (Покровский В.В., 2010). Именно низкий уровень Т-хелперов является предвестником присоединения микобактериальной и других инфекций в отсутствие профилактики противотуберкулёзными препаратами. Достоверных отличий при попарном сравнении 1 и 2 группы, и 3 и 4 группы выявлено не было, что свидетельствует об однородности исследуемых пар групп по количественному содержанию клеток CD4.

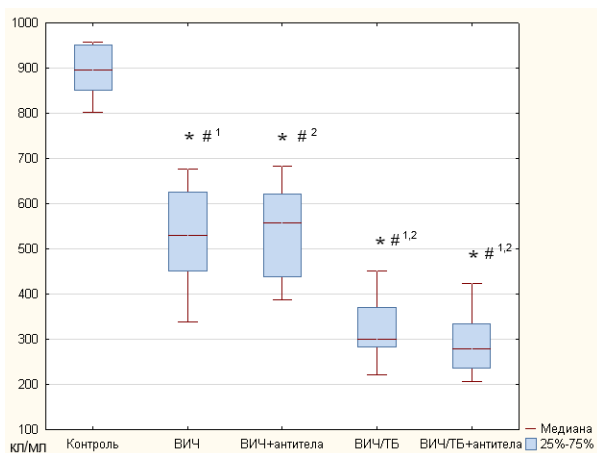


Рис 2. Содержание CD4 клеток в периферической крови пациентов до исследования Me [Q1-Q3].

Примечание: * - $p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни (отличия от контрольной группы)

- $p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни (отличия между группами)

Количество цитотоксических CD8 лимфоцитов было значимо ($p < 0,05$) повышенным во всех группах и отличалось от значений здоровых добровольцев почти в 2-3 раза. Самыми высокими значениями обладали пациенты групп ВИЧ-инфицированных с туберкулёзом, свидетельствуя об активном патологическом процессе (рис. 3).

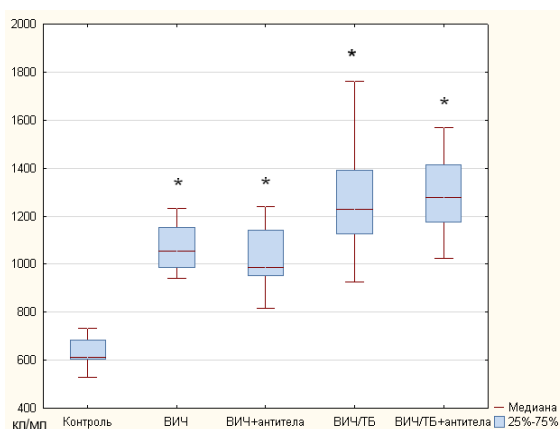


Рис 3. Содержание CD8 клеток в периферической крови пациентов до исследования Me [Q1-Q3].

Примечание: * - $p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни (отличия от контрольной группы)

Исходя из полученных данных, иммунорегуляторный индекс CD4/CD8 так же был значимо снижен, особенно в группах с туберкулёзом (рис. 4). Что также объясняется различными ранее проведенными исследованиями субпопуляций лимфоцитов у ВИЧ-инфицированных с ассоциированным туберкулёзом, характеризуя заметное угнетение иммунной системы при данном сочетании заболеваний. (Покровский В.В., 2010, Leroy V., Salmi L.R. et al., 1997) Повреждение CD4 клеток приводит к ослаблению альвеолярных макрофагов, тем самым усиливая распространение микобактерий туберкулёза. (Korenromp E.L., Scano F., et al., 2003) Таким образом, низкий уровень клеток CD4 повышает риск присоединения туберкулёзной инфекции.

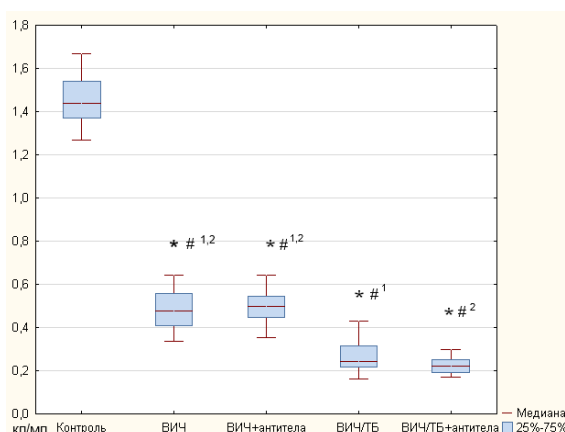


Рис. 4. Соотношение CD4/CD8 клеток в периферической крови пациентов до исследования Me [Q1-Q3].

Примечание: * - $p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни (отличия от контрольной группы)

- $p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни (отличия между группами)

Значимые ($p < 0,05$) изменения в количестве клеток CD3 по окончании обследований были обнаружены в 1 и 2 группах пациентов. Во всех группах независимо от наличия туберкулёза и приема исследуемых антител колебания содержания CD3-лимфоцитов были незначительными и продолжали оставаться на уровне ниже, чем в контрольной группе (рис. 5). Это подтверждает недостаточность клеточного иммунитета даже на фоне проведения противотуберкулёзной терапии и АРВТ.

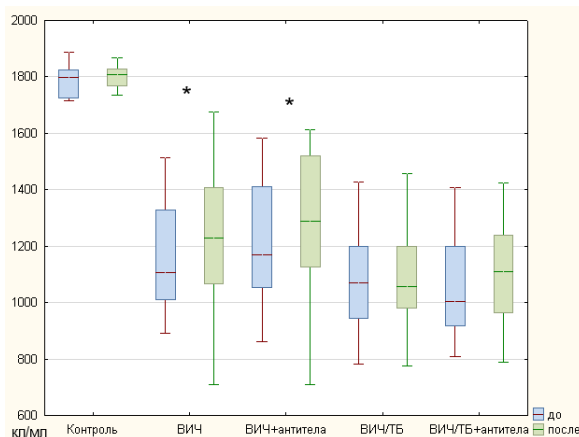


Рис. 5. Изменения содержания абсолютного количества CD3 клеток в периферической крови пациентов (до и после исследования) Me [Q1-Q3].

Примечание: * - $p < 0,05$, W критерий Уилкоксона (отличия до и после терапии)

Анализ содержания CD4 выявил повышение выработки Т-хелперов с течением времени на фоне проводимой терапии. Достоверный прирост количества CD4 клеток наблюдался лишь во 2 группе и в 4 группе (ВИЧ-инфицированных пациентов с туберкулёзом) (рис. 6), принимавших антитела к интерферону-гамма и CD4. В 3 группе в отсутствие антиретровирусной терапии количество CD4 лимфоцитов снизилось спустя 2,5 месяца противотуберкулёзной химиотерапии. Но несмотря на то, что достоверных отличий не было, после сравнения результатов лечения групп 3 и 4, были обнаружены значимые ($p < 0,05$) отличия в характере изменений (рис. 6,7), позволяя предположить, что антитела к CD4 оказывают сенситизирующее влияние на данный рецептор, повышая функциональную активность и количество клеток CD4.

Несмотря на отсутствие антиретровирусной терапии в группах с туберкулёзом, достоверные изменения позволяют отметить эффективное влияние исследуемого препарата на количество CD4-лимфоцитов. Тактика лечения туберкулёза у ВИЧ-положительных пациентов предполагает в первую очередь назначение противотуберкулёзной химиотерапии, затем лишь через 2 месяца интенсивной терапии при низких значениях CD4 (менее 200 кл/мл) включают применение антиретровирусных препаратов (Протоколы лечения больных ВИЧ-инфекцией, принятые национальным обществом инфекционистов, 2011, WHO, 2012). Это связано, прежде всего с негативным взаимодействием противотуберкулёзных препаратов и АРВТ, увеличивающим количество тяжелых побочных эффектов (периферические нейропатии, гепатиты, сыпь, диспептические расстройства) (Yee D, Valiquette C. Et al., 2003,

Dean G.L., Edwards S.G. et al., 2002). Лишь в критических случаях ($CD4 < 50$ кл/мл) используют одновременное назначение АРВТ и ППТ. (WHO, 2012) Таким образом, оправдано использование препарата на основе антител к CD4 у ВИЧ-инфицированных пациентов в начале терапии туберкулёзом, в связи с наличием эффектов аналогичных применению антиретровирусных препаратов, но значительно меньшим количеством побочных эффектов.

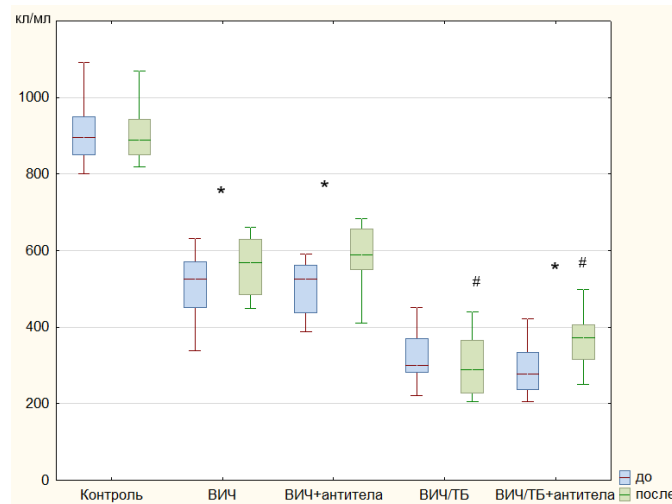


Рис. 6. Изменения содержания абсолютного количества CD4 клеток в периферической крови пациентов (до и после исследования) Me [Q1-Q3].

Примечание: * - $p < 0,05$, W критерий Уилкоксона (отличия до и после терапии)

- $p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни (отличия между группами после исследования)

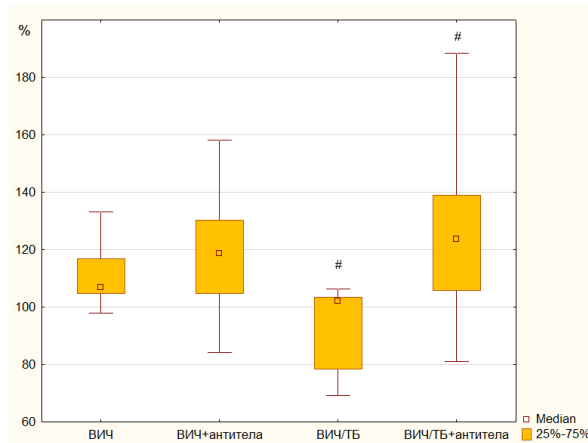


Рис. 7. Относительные изменения содержания CD4 клеток в периферической крови пациентов (до и после исследования в связанных выборках в %) Me [Q1-Q3].

Примечание: # - $p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни (отличия между группами после исследования)

В свою очередь количество цитотоксических лимфоцитов значительно не изменилось ни в одной из исследуемых групп (рис. 8).

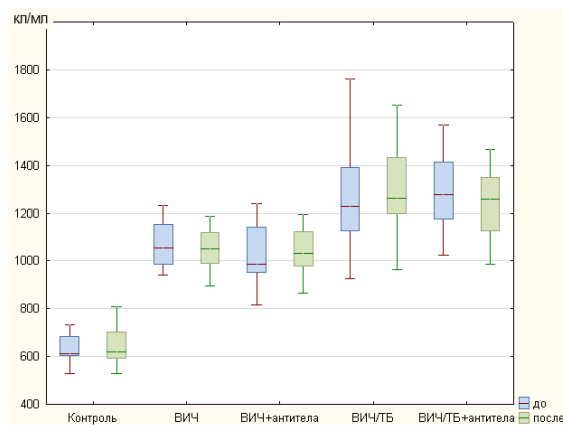


Рис. 8. Изменения содержания абсолютного количества CD8 клеток в периферической крови пациентов (до и после исследования) Me [Q1-Q3].

Таким образом, увеличение количества клеток CD4 и сохранение содержания CD8 лимфоцитов позволило повысить уровень иммунорегуляторного индекса CD4/CD8. Данный показатель достоверно ($p < 0,05$) увеличился в 1,2,4 группах (рис. 9). В 3 группе значимых изменений не произошло, но при попарном сравнении результатов групп с туберкулезом было выявлено значимое отличие в изменении иммунорегуляторного индекса. Аналогично повышению количества CD4 лимфоцитов, исследуемый препарат на основе антител продемонстрировал положительную динамику в изменении одного из главных показателей эффективности лечения - иммунорегуляторного индекса. Принимая во внимание то, что вирусная нагрузка в 4 группе также снизилась, можно предположить, что пополнения пула эффекторных CD4 клеток происходило за счет подавления репликации вирусной РНК и предотвращения инфицирования новых клеток Т-хелперов.

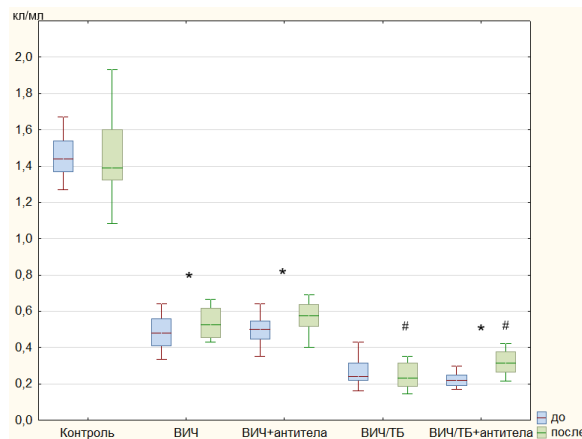


Рис. 9. Изменения иммунорегуляторного индекса CD4/CD8 в периферической крови пациентов (до и после исследования) Me [Q1-Q3].

Примечание: * - $p < 0,05$, W критерий Уилкоксона (отличия до и после терапии)

- $p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни (отличия между группами после исследования)

Наибольший интерес представляет исследование цитокинового профиля пациентов, так как одним из компонентов препарата на основе антител являлись антитела к интерферону-гамма. В формировании активной защиты против вирусных белков и микобактерий участвует целый комплекс

иммунорегуляторных цитокинов (Flynn J.L. et al., 2004, Flesch I.E., 1993). Именно с интерферона-гамма и началось исследование клеточного иммунитета ВИЧ инфицированных больных.

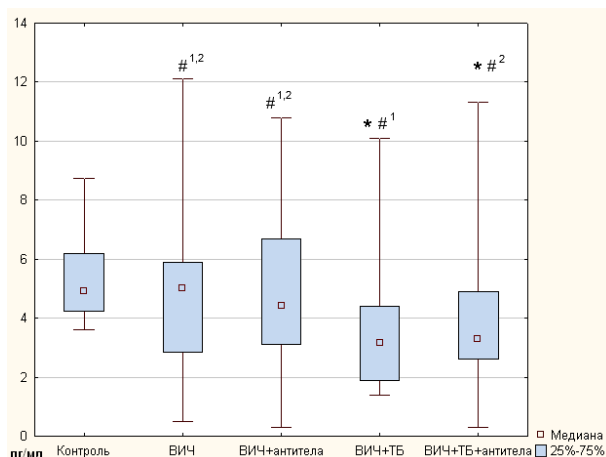


Рис. 10. Концентрация интерферона-гамма в крови пациентов до начала исследования Me [Q1-Q3].

Примечание: * - $p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни (отличия от контрольной группы)

- $p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни (отличия между группами)

В результате определения концентрации интерферона-гамма до начала исследования, было установлено значимое ($p < 0,05$) снижение показателей данного цитокина по сравнению с контрольной группой в 3 и 4 группах ВИЧ-инфицированных пациентов с ассоциированным туберкулёзом (рис. 10), подтверждая наличие иммунного воспаления (гиперчувствительность замедленного типа) в местах репликации вирусной РНК.

Помимо интерферона-гамма сдерживающим фактором прогрессирования ВИЧ являются провоспалительные интерлейкины 2 и 12, участвующие в пролиферации и дифференцировке цитотоксических лимфоцитов. Во всех исследуемых группах содержание IL-2 было увеличено минимум в 2 раза ($p < 0,05$) (рис. 11).

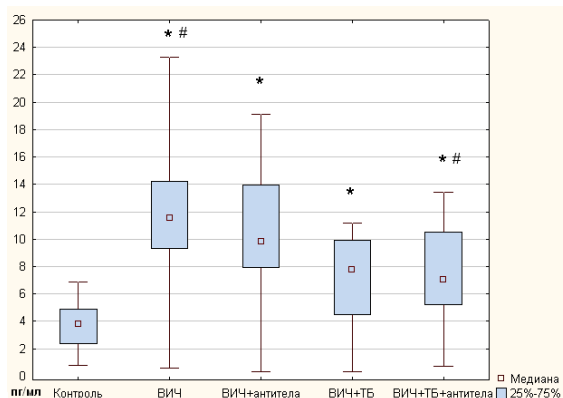


Рис. 11. Концентрация интерлейкина-2 в крови пациентов до начала исследования Me [Q1-Q3].

Примечание: * - $p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни (отличия от контрольной группы)

- $p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни (отличия между группами)

После определения начальной концентрации ИЛ-12 во всех группах было отмечено заметное ($p < 0,05$) снижение содержания данного цитокина по сравнению с группой здоровых добровольцев (рис. 12). Причем у пациентов с туберкулезом значение ИЛ-12 было наименьшим. Цитокин ИЛ-12 (активный гетеродимер - р70) синтезируется антиген-презентирующими клетками, модулирует адаптивный иммунный ответ при бактериальных инфекциях (в том числе при заражении микобактериями туберкулеза) и участвует в создании антибактериального ответа иммунной системы (Фрейдлин И.С., 1999, Namza T., Barnett J.V. et al., 2010). Активация секреции данного цитокина происходит с участием интерферона-гамма Т-хелперами 1 типа (Th1), при этом вновь появившиеся молекулы эндогенного ИЛ-12 способны стимулировать интактные Th1- клетки, увеличивая продукцию ими интерферона-гамма. Также IFN- γ , участвуя в формировании Th1 ответа, повышает чувствительность наивных Т-хелперов к интерлейкину 12. (Fulton S.A., Johnsen J.M., 1996, Trinchieri G., 1998) Таким образом, влияние ИЛ-12 на выработку интерферона гамма основано на положительной обратной связи. (Sodhi A, Gong J., 1997) Но в реальной практике оценка уровня цитокинов и поиск зависимостей образования данных механизмов иммунного ответа вызывает затруднения, ввиду многообразия проявлений туберкулезной инфекции при сочетанном поражении организма вирусом иммунодефицита человека. Пример тому немногочисленные и противоречивые данные исследований уровней про- и противовоспалительных цитокинов и их роли в формировании иммунной защиты у ВИЧ-инфицированных пациентов с ассоциированным туберкулезом. (Wolday D., 2003, Mukadi Y.D., 2001, Perriens J.H., 1995) Именно поэтому, для поддержания однородности выборки оценивались показатели у пациентов с инфильтративной формой туберкулеза, клинические проявления которой схожи с данным заболеванием у ВИЧ-негативных людей.

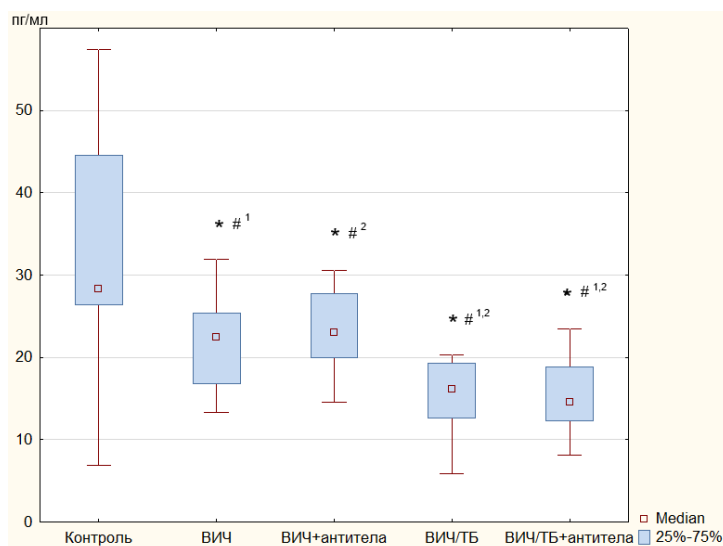


Рис. 12. Концентрация интерлейкина-12 в крови пациентов до начала исследования Me [Q1-Q3].

Примечание: * - $p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни (отличия от контрольной группы)

- $p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни (отличия между группами)

Продукция IL-2, IL-12 и INF- γ характеризует состояние клеточного иммунного Th1 ответа. В то время как цитокины IL-4, -5, -6, -10, синтезируясь Th2 клеткам, стимулируют гуморальное звено иммунитета. Именно INF- γ и IL-4 являются ключевыми в формировании адаптивного клеточного и гуморального ответа. (Amadori A., et al., 2007) В нашем исследовании концентрации IL-4 так же были повышены, значимо ($p < 0,05$) в 4 группе пациентов (рис. 13). Также в группах с туберкулёзом содержание данного цитокина было заметно выше такового у пациентов с моноинфекцией ВИЧ.

В современной литературе имеются достаточно противоречивые данные об изменении цитокинового профиля ВИЧ-инфицированных больных при сочетанном заболевании туберкулёзом. Некоторые исследования показывают смещение баланса в сторону Th2 опосредованного гуморального звена иммунного ответа, за счет повышения выработки IL-4 на фоне снижения INF- γ и IL-2, угнетения клеточного иммунитета, таким образом указывая на утяжеление состояния иммунодефицита. (Cavalcanti Y.V., 2009, Lajoie J., 2008, Agarwal S.K., et al., 2001) Другие ученые напротив наблюдали повышение выработки INF- γ у ВИЧ/Тб пациентов. (Mayanja-Kizza H., et al., 2003, Winkler S., et al., 2005) В нашем случае преобладание IL-4 отмечено в группах с туберкулёзом. Таким образом, в нашем исследовании, сочетанная инфекция ВИЧ/Тб характеризовалась сниженным содержанием INF- γ , IL-2 и повышенным IL-4, позволяя предположить смещение баланса в сторону клеточного Th2 ответа.

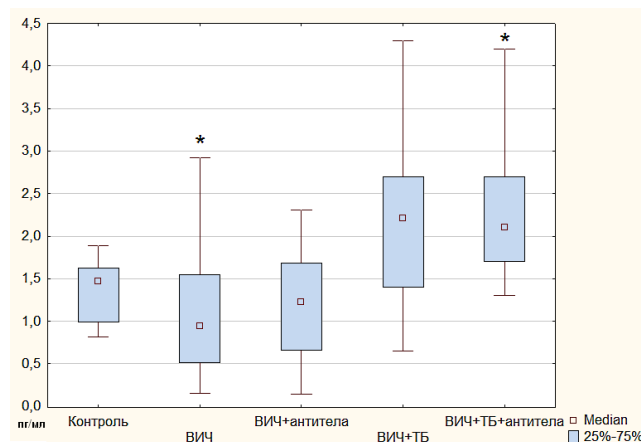


Рис. 13. Концентрация интерлейкина-4 в крови пациентов до начала исследования Me [Q1-Q3].

Примечание: * - $p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни (отличия от контрольной группы)

Анализ изменений концентрации цитокинов выявил значимое повышение содержания IL-2 (Т-клеточного ростового фактора) в 4 группе пациентов с туберкулёзом легких на фоне применения препарата на основе антител (рис. 14). Возможно предположить, что препарат антител к CD4, повысив чувствительность рецепторов на поверхности Т-хелперов, стимулировал выработку ими IL-2. В дополнение к этому свидетельствует тот факт, что в группе пациентов, принимавших антитела к интерферону-гамма и CD4 увеличилось абсолютное количество эффекторных клеток. Аналогичное

повышение было отмечено и во 2 группе ВИЧ-инфицированных пациентов, принимающих препарат. Плюс ко всему, пациенты 2 группы принимали антиретровирусную терапию и возможные наблюдаемые изменения связаны именно с эффективностью данной группы препаратов, не позволяя достоверно определить вклад исследуемого препарата на основе антител. В 1 и 3 группе уровень ИЛ-2 значимо не изменился.

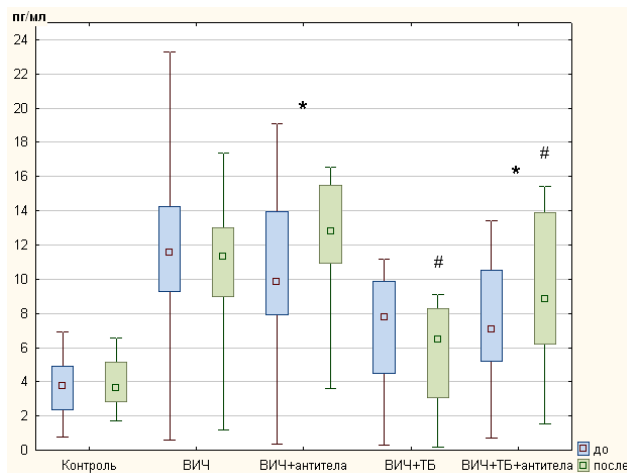


Рис. 14. Изменения содержания интерлейкина-2 в крови пациентов (до и после исследования) Me [Q1-Q3].

Примечание: * - $p < 0,05$, W критерий Уилкоксона (отличия до и после терапии)

- $p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни (отличия между группами после исследования)

По окончании исследования отмечалось заметное увеличение концентрации ИЛ-4 в 1 и 2 группах (рис. 15). Возможно, это связано применением АРВТ, т.к. в 4 группе пациентов, принимавших исследуемый препарат, значимых отличий после терапии выявлено не было.

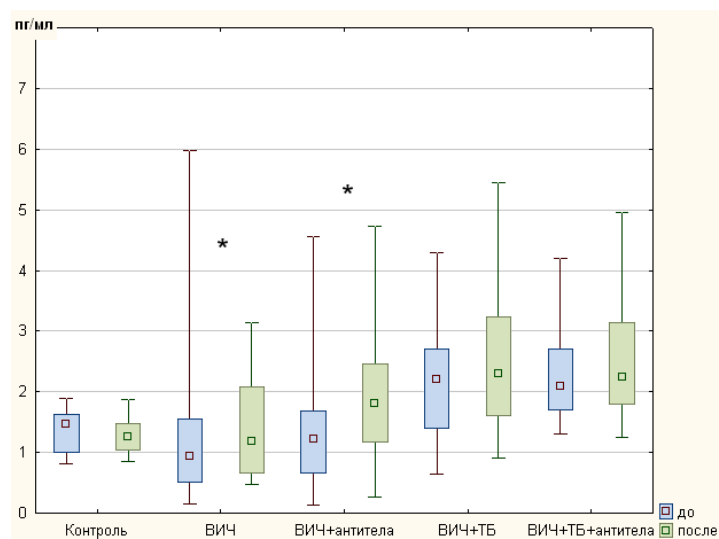


Рис. 15. Изменения содержания интерлейкина-4 в крови пациентов (до и после исследования) Me [Q1-Q3].

Примечание: * - $p < 0,05$, W критерий Уилкоксона (отличия до и после терапии)

- $p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни (отличия между группами после исследования)

Согласно результатам зарубежных исследований (Lajoie J., 2008, Mummidi S., 1998, Montaner L., Gordon S., 1994, Vyakarnam A. et al., 1994), интерлейкин-4 препятствует проникновению вирусной РНК в новые клетки. Таким образом, повышение концентрации данного цитокина в сочетании с увеличением абсолютного числа Т-лимфоцитов благоприятно скажется на эффективности лечения ВИЧ-положительных пациентов.

Продукты жизнедеятельности микобактерий угнетают функции исследуемых клеток, приводя к снижению выработки IL-12 – одного из основных цитокинов формирующих антибактериальный ответ.

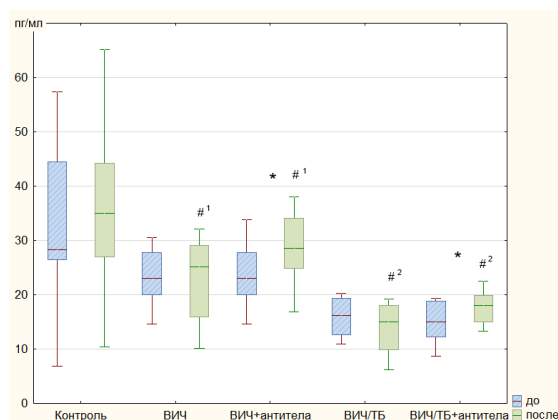


Рис. 16. Изменения содержания интерлейкина-12 в крови пациентов (до и после исследования) Me [Q1-Q3].

Примечание: * - $p < 0,05$, W критерий Уилкоксона (отличия до и после терапии)

- $p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни (отличия между группами после исследования)

Концентрации IL-12 достоверно выросла во 2 и 4 группах пациентов, принимавших исследуемый препарат на основе антител. Вероятно под влиянием экзогенных антител к CD4 опосредованно через интерферон-гамма, произошло смещение концентрации цитокина IL-12 в большую сторону. Таким образом, возможно предотвращая угнетение антибактериального иммунитета. (Кетлинский С.А. и соавт., 2005)

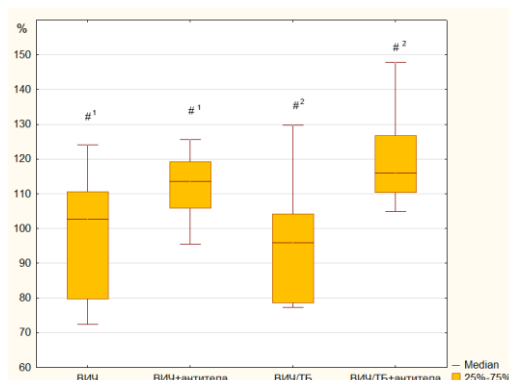


Рис. 17. Относительные изменения концентраций IL-12 в периферической крови пациентов (до и после исследования в связанных выборках в %) Me [Q1-Q3].

Примечание: # - $p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни (отличия между группами после исследования)

Несмотря на то, что прямого противовирусного действия ИЛ-12 не оказывает, его исследование и поиск способов стимуляции его выработки могут быть полезны в целях предотвращения риска развития бактериальных ко-инфекций у пациентов с ВИЧ (Lakhashe S.K. et al., 2005).

Интерферон-гамма является одним из ключевых активаторов клеточного иммунитета. Значимые ($p < 0,05$) изменения его концентрации произошли во 2 и 4 группе. На фоне приема препарата на основе антител наблюдалось значительное повышение содержания данного цитокина (рис. 18, 19). Тогда как в других наблюдаемых группах уровень интерферона-гамма изменился незначительно.

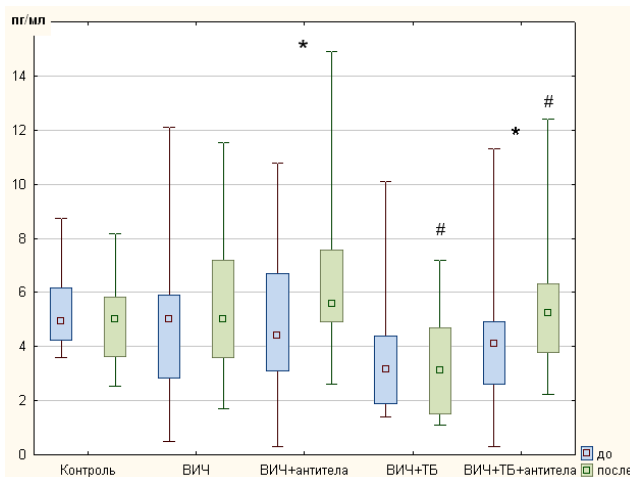


Рис. 18. Изменения содержания интерферона-гамма в крови пациентов (до и после исследования) Me [Q1-Q3].

Примечание: * - $p < 0,05$, W критерий Уилкоксона (отличия до и после терапии)

- $p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни (отличия между группами после исследования)

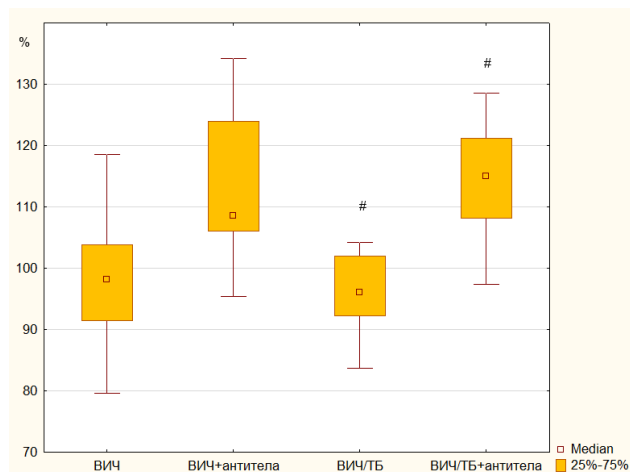


Рис. 19. Относительные изменения концентраций интерферона-гамма в периферической крови пациентов (до и после исследования в связанных выборках в %) Me [Q1-Q3].

Примечание: # - $p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни (отличия между группами после исследования)

Снижение вирусной нагрузки в первых двух группах ВИЧ-положительных пациентов без туберкулёза показало значительное превосходство антиретровирусной терапии. Уменьшение количества копий вирусной РНК в этих группах связано, прежде всего, с приемом антиретровирусных препаратов. Выделить прямой эффект от применения препарата на основе антител в данном случае не представляется возможным ввиду синергичного влияния препаратов и отсутствия значимого статистического изменения до и после терапии. В 3 группе больных ВИЧ/Тб у всех пациентов отмечалось повышение вирусной нагрузки. Вероятнее всего, в отсутствие АРВТ у пациентов с применением только противотуберкулёзных препаратов увеличивается экспрессия ВИЧ. Именно поэтому согласно последним рекомендациям (Протоколы лечения больных ВИЧ-инфекцией, принятые национальным обществом инфекционистов, 2009, WHO, 2010), желательно через 2 месяца после фазы интенсивного приема противотуберкулёзной химиотерапии или при снижении количества CD4-клеток менее 200 включать в схему лечения высокоактивные антиретровирусные препараты. Полученные данные позволяют предположить, что возможно у части пациентов с ВИЧ и туберкулёзом подавление репликации вирусной РНК может быть связано с эффектами косвенно связанными с применением исследуемого препарата на основе антител к интерферону-гамма и CD4 (увеличение секреции IFN- γ , IL-2, IL-4).

Основываясь на полученных результатах, можно заключить, что проведенная терапия антителами к интерферону-гамма и CD4 привела к положительному изменению функциональной активности Т-лимфоцитов. Предполагается рациональным мониторинг концентраций IL-2, IL-12 и интерферона-гамма для контроля эффективности противотуберкулёзной терапии ВИЧ-инфицированных больных и определения момента необходимости включения в схему высокоактивной антиретровирусной терапии, а также для выявления риска развития туберкулёза у ВИЧ инфицированных пациентов.

Таким образом, стимуляция образования Th1 клеток, активирующих синтез важных иммунорегуляторных цитокинов, является обоснованным и перспективным направлением терапии туберкулёза у ВИЧ положительных пациентов. Исследуемый препарат на основе антител к CD4 и гамма-интерферону, на фоне повышения секреции IL-2, IL-12 и интерферона-гамма, увеличения CD4 изменяет патогенетическую картину заболевания туберкулёза, что позволяет рекомендовать его в дополнение к химиотерапии противотуберкулёзными препаратами у ВИЧ-положительных пациентов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выводы

1. После приема препарата на основе антител к CD4 и интерферону-гамма человека три раза в день до еды по одной таблетке на приём в течение 2,5 месяцев у ВИЧ-инфицированных пациентов с туберкулёзом произошло увеличение абсолютного числа CD4 лимфоцитов в среднем на 23,75% (от 6,18 до 37,32).

2. В результате приема препарата на основе антител к CD4 и интерферону-гамма человека у ВИЧ-положительных пациентов с ассоциированным туберкулёзом вырос иммунорегуляторный индекс CD4/CD8. В процентном соотношении исследуемый препарат достоверно повысил уровень индекса CD4/CD8 на 33,12% (от 16,04 до 48,33).

3. После приема препарата повышается выработка регуляторных интерлейкина-2, интерферона-гамма, усиливающих антибактериальный и противовирусный ответ. Особо значимые изменения отмечались у ВИЧ-инфицированных больных с ассоциированным туберкулёзом на фоне приема исследуемого препарата: концентрация интерлейкина-2 выросла на 4,64% (от 1,37 до 13,48), интерферона-гамма на 15,06% (от 8,78 до 21,05).

4. Прием исследуемого препарата три раза в день до еды по одной таблетке на приём в течение 2,5 месяцев стимулирует выработку интерлейкина-12 у ВИЧ-положительных пациентов с ассоциированным туберкулёзом, повышая концентрацию данного цитокина в среднем на 15,98% (от 10,99% до 25,08%).

Практические рекомендации

1. Полученные результаты позволяют рекомендовать применение препарата на основе антител к CD-4 и гамма-интерферону человека в качестве перспективного иммуномодулирующего и противовирусного средства для лечения ВИЧ-положительных пациентов с ассоциированным туберкулёзом.
2. Рекомендовать к дальнейшему изучению применения исследуемого препарата как дополнение к активной противотуберкулёзной терапии с целью повышения защитных функций Т-лимфоцитов во время отсутствия терапии антиретровирусными препаратами.
3. Использовать полученные данные в учебно-методических пособиях и рекомендациях на практических занятиях посвященных проблемам лечения и профилактики туберкулёза у ВИЧ-положительных пациентов.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Препарат на основе антител к CD4 и интерферону-гамма человека может быть использован для дальнейшего изучения влияния на состояние иммунной системы, изменение вирусной нагрузки у ВИЧ-инфицированных пациентов с туберкулёзом в фазе активной терапии противотуберкулёзными препаратами, когда сочетанное применение с антиретровирусными препаратами может сопровождаться тяжелыми побочными эффектами. Отмеченное повышение концентрации интерлейкина-12 на фоне приема исследуемого препарата на основе антител, может иметь важное значение в профилактике возникновения туберкулёза у ВИЧ-инфицированных больных.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. **Кляусов, А.С. Эффективность иммуотропного действия антител к CD-4 и гамма-интерферону человека при лечении ВИЧ-инфицированных больных с ассоциированным туберкулезом // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2013. – №3 (47). – С. 38.**

Другие публикации по теме диссертации

2. Кляусов, А.С. Влияние антител к CD4 и гамма-интерферону человека на состояние иммунной системы у ВИЧ-инфицированных больных с ассоциированным туберкулёзом / А.С. Кляусов, А.В. Стрыгин, С.А. Осипов // Российский аллергологический журнал. Труды XII международного конгресса «Современные проблемы иммунологии, аллергологии и иммунофармакологии» - Москва, 2013. –№2. – С.140

3. Кляусов, А.С. Иммуномодулирующее действие антител к CD4 и гамма-интерферону человека при лечении ВИЧ-инфицированных больных с ассоциированным туберкулёзом // Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины: материалы 71-й открытой науч.-практ, конф, молодых ученых и студентов с междунар, участием. – Волгоград: Изд-во ВолгГМУ, 2013. – С. 187.
4. Осипов С.А., Стрыгин А.В., Кляусов А.С. Клинико-лабораторная эффективность антиретровирусной терапии в сочетании с препаратом на основе антител к CD4 и гамма-интерферону человека у ВИЧ-инфицированных лиц с ассоциированным вирусным гепатитом С // Материалы V ежегодного Всероссийского конгресса по инфекционным болезням. – Москва, 2013. – С. 301.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АРВТ - антиретровирусная терапия

ВААРТ – высокоактивная антиретровирусная терапия

ВИЧ - вирус иммунодефицита человека

ВОЗ, WHO - всемирная организация здравоохранения

ИЛ, IL - интерлейкины

ИФН-γ - интерферон гамма

МБТ - микобактерия туберкулеза

НИИОТ - нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы

НИОТ - нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы

ПЦР - полимеразная цепная реакция

РНК - рибонуклеиновая кислота

T6 – туберкулез

Th – Т-хелпер

КЛЯУСОВ АНДРЕЙ СЕРГЕЕВИЧ

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИММУНОТРОПНОГО ДЕЙСТВИЯ
АНТИТЕЛ К CD-4 И ГАММА-ИНТЕРФЕРОНУ ЧЕЛОВЕКА
ПРИ ЛЕЧЕНИИ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ БОЛЬНЫХ С
АССОЦИИРОВАННЫМ ТУБЕРКУЛЕЗОМ**

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Подписано в печать 21.10.2013. Формат 60x84/16. Бумага офсетная.
Гарнитура Times New Roman. Печать офсетная. Уч.-изд. л. 1,0.
Тираж 100. Заказ 434/9

Отпечатано с готового оригинал-макета заказчика
в типографии издательства «Перемена»
400066, г. Волгоград, пр. им. В. И. Ленина, 27