

острых кишечных инфекций // Достижения отечественной эпидемиологии в XX веке. Взгляд в будущее. СПб., 2001. С. 104–105.

9. Яковлев А.А. Концепция интеграционно-конкурентного развития эпидемического процесса // Тихоокеанский медицинский журнал. 2006. № 3. С. 10–15.

Поступила в редакцию 24.02.2010.

INTEGRATION APPROACH FOR STUDYING SPATIAL DISTRIBUTION OF HEPATITIS A AND FLEXNER'S DYSENTERY IN PRIMORSKY KRAI

A.A. Yakovlev, S.N. Karamova, N.I. Sergienko, I.N. Pozharskaya
Vladivostok State Medical University (2 Ostryakova Av. Vladivostok 690950 Russia)

Summary – The epidemiology traditionally considers epidemiological process isolated from other infections. As indicated in integration competitive development of epidemiological process concept (Yakovlev, 1996–2006), all infections of common localization and transmission mechanism can directly or indirectly on a population level affect the progress of epidemiological process of each other. The authors analyze probable effect on spatial aspects of distribution of hepatitis A virus and Flexner's dysentery in Primorsky Krai and integration competitive mechanisms of their interaction.

Key words: epidemic process, hepatitis A virus, dysentery, integration competitive interaction.

Pacific Medical Journal, 2010, No. 3, p. 51–55.

УДК 616.36-002.2-085.322:582.272

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ВИРУСНЫМ ГЕПАТИТОМ С ПРИ ВКЛЮЧЕНИИ В КОМПЛЕКС ЛЕЧЕНИЯ ФУКОИДАНА ИЗ *FUCUS EVANESCENS*

Н.В. Филонова¹, Т.С. Запорожец¹, С.А. Ермолицкая², Л.В. Лебедева², И.А. Пожидаева², Т.Н. Звягинцева³, М.И. Кусайкин³

¹ НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (690087 г. Владивосток, ул. Сельская, 1),

² Городская клиническая инфекционная больница № 1 (690043 г. Владивосток, ул. Крыгина, 19),

³ Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН (690022 г. Владивосток, пр-т 100 лет Владивостоку, 159)

Ключевые слова: хронический вирусный гепатит С, фукоидан, клеточный иммунитет.

Проведен сравнительный анализ основных субпопуляций лимфоцитов периферической крови и маркеров их активации у пациентов с хроническим вирусным гепатитом С, в комплекс лечения которых был включен фукоидан в составе биологически активной добавки к пище «Фуколам», и пациентов, получавших только базисную терапию. Установлено корректирующее влияние фукоидана на показатели активации лимфоцитов. Биологически активная добавка «Фуколам» рекомендуется авторами для использования в комплексе терапевтических мероприятий при хроническом вирусном гепатите С.

Вирусный гепатит С представляет собой одну из наиболее важных проблем здравоохранения ввиду высокой частоты хронизации (до 85–90%), развития цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы [5]. Согласно современным представлениям, ответ макроорганизма на внедрение вируса сопровождается активацией врожденного и адаптивного иммунитета, включающего клеточные и гуморальные реакции. Ведущая роль в элиминации вируса отводится Т-клеточному иммунному ответу. Т-хелперы, распознающие антиген вируса на поверхности антигенпредставляющих клеток в совокупности с молекулами главного комплекса гистосовместимости 2-го класса, пролиферируют и дифференцируются в клетки 1-го и 2-го типов. Т-хелперы 1-го типа активируют цитотоксические лимфоциты и макрофаги, Т-хелперы 2-го типа способствуют дифференцировке В-лимфоцитов

в плазматические клетки, секретирующие вируснейтрализующие антитела [11]. Дисбаланс в соотношении Т-хелперов 1-го и 2-го типов и их цитокинов в сторону гуморального ответа может являться главной причиной хронизации и прогрессирования инфекции [13]. Несмотря на многочисленные исследования, многие аспекты иммунопатогенеза вирусного гепатита С остаются недостаточно изученными.

Сложной является и ситуация в отношении терапии пациентов с хроническим вирусным гепатитом (ХВГ) С. Базисное лечение включает в себя охранительный режим, лечебное питание, дезинтоксикационную и метаболическую терапию. Этиотропное лечение основано на применении рекомбинантных интерферонов в сочетании с синтетическими аналогами нуклеозидов [10]. Однако наличие множества противопоказаний к их назначению, высокая стоимость, побочное действие, недостаточная эффективность, длительность приема диктуют необходимость поиска новых эффективных средств, в том числе с иммуномодулирующей активностью. В последнее время опубликовано много работ, посвященных терапевтическому потенциалу фукоиданов – сульфатированных гомо- и гетерополисахаридов из бурых водорослей, обладающих широким спектром биологической активности [3, 4]. Установлено, что эти соединения обладают иммуномодулирующими, противовоспалительными, цитокининдуцирующими и антикоагулянтными свойствами [2]. Известны противовирусные свойства фукоиданов, заключающиеся в подавлении проникновения вируса в клетку хозяина

Филонова Наталья Владимировна – младший научный сотрудник лаборатории иммунологии НИИЭМ СО РАМН; тел.: 8 (4232) 44-24-46, e-mail: docfil2@rambler.ru

Таблица

Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови пациентов с ХВГ С до начала терапии, %

Показатель	Пациенты с ХВГ С		Доноры	
	М±σ ¹	Ме (25–75) ²	М±σ ¹	Ме (25–75) ²
CD3 ⁺	71,30±8,95	73 (66,1–77)	73,30±5,40	73,5 (68–78)
CD4 ⁺	44,10±9,33	43 (37–51,8)	47,13±4,90	47,5 (43–52)
CD8 ⁺	25,43±8,20	27 (19–30)	25,13±5,50	24,5 (21–28)
NK ³	9,88±5,45	9 (7–12)	10,40±4,80	9 (7–14)
TNK ⁴	3,67±3,63	2,3 (0,8–4,4)	3,20±3,70	2,1 (1,3–4,4)
CD19 ⁺	13,01±6,35	12 (8,3–16,5)	12,60±3,20	13 (10–16)
CD25 ⁺	9,43±4,14	8,8 (6,1–13)	10,59±2,30	10 (9,5–12)
CD95 ⁺	10,36±8,03 ⁵	8 (5,4–12,8) ⁵	5,80±2,70	6 (4–7)
HLA-DR ⁺	19,10±7,10 ⁵	18,7 (15,3–22) ⁵	15,90±2,70	17 (12,5–18)

¹ Средняя арифметическая и стандартное отклонение.² Медиана и квантили.³ Натуральные киллеры: CD3⁺CD16⁺CD56⁺.⁴ Натуральные киллеры с фенотипом Т-лимфоцитов: CD3⁺CD16⁺CD56⁺.⁵ Разница с группой доноров статистически значима.

за счет связывания с определенными мембранными молекулами на клеточной поверхности, что препятствует пенетрации клеточной стенки [14].

Целью настоящей работы был анализ показателей иммунного статуса у пациентов с ХВГ С и оценка эффективности применения низкомолекулярного фукоидана – сульфатированного полисахарида из бурой водоросли Охотского моря *Fucus evanescens* в составе биологически активной добавки (БАД) к пище «Фуколам» в комплексном лечении заболевания.

Материал и методы. Обследовано 57 пациентов с ХВГ С и 22 условно здоровых донора в возрасте от 18 до 49 лет (средний возраст – 39,2±8,9 г.). Все эксперименты и клинические исследования выполнены с разрешения комитета по биомедицинской этике НИИЭМ СО РАМН (протокол № 5 от 30.06.2004 г.). Пациенты находились на стационарном лечении в Городской клинической инфекционной больнице № 1 Владивостока. Диагноз ХВГ С был обоснован данными клинико-эпидемиологических, лабораторных и инструментальных методов исследования, подтверждался выявлением специфических серологических маркеров методом иммуноферментного анализа и обнаружением РНК вируса в полимеразной цепной реакции. Все пациенты получали базисную терапию, включающую охранительный режим, лечебное питание, дезинтоксикацию и метаболическую поддержку. Основная группа (27 человек) еще получала БАД «Фуколам» по 1 капсуле 2 раза в сутки 14 дней (содержание действующего вещества в капсуле – 100 мг). Контрольную группу составили 30 человек, получавших только базисную терапию. БАД «Фуколам» на основе фукоидана из *Fucus evanescens* обладает широким спектром биологической активности, основными проявлениями которой являются иммуномодулирующие, цитокининдуцирующие и противовирусные свойства, зарегистрирована в РФ (свидетельство о государственной регистрации № 77.99.23.3.У739.1.06, ТУ 9284–065–02698170–2005). Противовирусные препараты в комплекс лечения включены не были.

Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови и активационных маркеров выполнялось на проточном цитометре FACS Calibur с использованием прямых моноклональных антител к кластерам дифференцировки (Cluster of Differentiation – CD) CD3, CD4, CD8, CD16/CD56, CD19 фирмы Becton Dickinson, CD25, HLA-DR фирмы Beckman Coulter, CD95-FITC – ООО «Медбио-спектр». Исследование проводилось дважды: до начала лечения и после его окончания. Статистическую обработку данных выполняли с помощью прикладной программы «Геостат» [9]. Использовались следующие методы статистического анализа: проверка нормальности распределения количественных признаков в выборке с помощью критерия Шапиро–Уилка, сравнение показателей с помощью критерия Стьюдента (для факторов, имеющих нормальное распределение), критерия Манна–Уитни и критерия Вилкоксона (для факторов с альтернативным распределением).

Результаты исследования. Сравнительный анализ средних значений относительного содержания основных субпопуляций лимфоцитов до начала терапии не показал значимых различий между показателями в группе пациентов с ХВГ С и у здоровых доноров.

Важным моментом оценки состояния клеточного иммунитета является определение количества активированных Т-лимфоцитов – CD25⁺, CD95⁺, HLA-DR⁺. У части пациентов с ХВГ С уровень экспрессии CD25 на лимфоцитах был в пределах нормальных значений либо повышенным, в 44 % случаев наблюдался пониженный уровень экспрессии этого антигена. Средние значения относительного содержания лимфоцитов, несущих на своей поверхности проапоптотическую молекулу CD95, у больных ХВГ С до лечения были достоверно выше, чем у здоровых лиц. Исследование «позднего» активационного маркера HLA-DR показало, что относительное содержание экспрессирующих его лимфоцитов в группе лиц с гепатитом до начала терапии значимо превышало средние значения этого показателя в группе условно здоровых доноров (табл.).

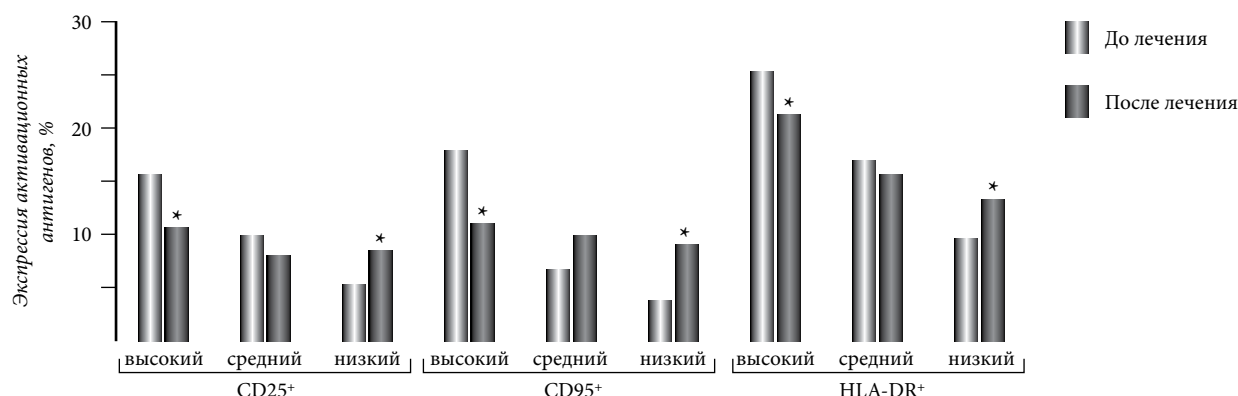


Рис. 1. Модуляция уровня экспрессии активационных антигенов лимфоцитами при включении БАД «Фуколам» (* разница с показателем до лечения статистически значима).

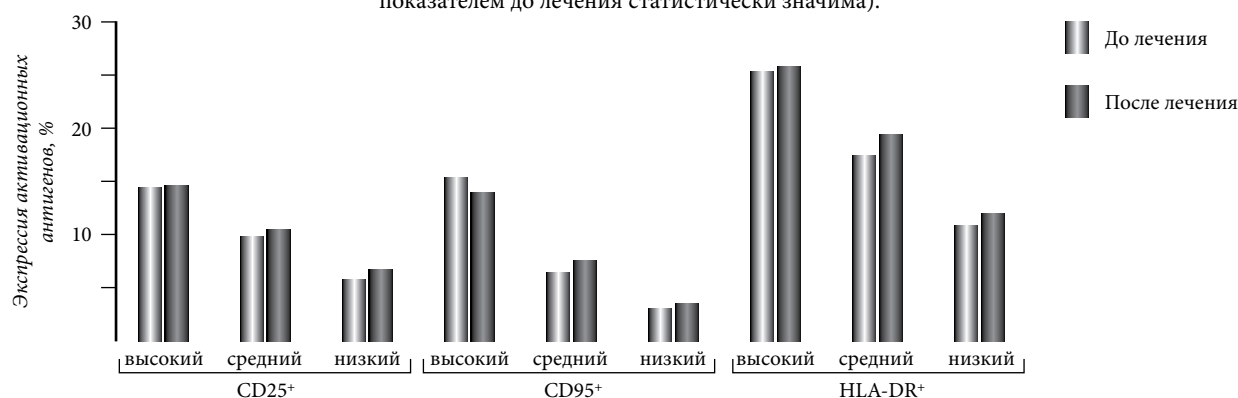


Рис. 2. Уровень экспрессии активационных антигенов лимфоцитами без включения БАД «Фуколам».

Анализ состояния иммунного статуса после лечения проводили с учетом исходного уровня активированных лимфоцитов. С этой целью пациенты с ХВГ С были разделены на три подгруппы:

- 1) с высоким уровнем активированных клеток (выше или в пределах верхней границы нормы);
- 2) со средними уровнем активированных клеток (в пределах средних значений нормы);
- 3) с низким уровнем активированных клеток (ниже или в пределах нижней границы нормы).

В подгруппе с исходно высоким уровнем активированных клеток CD25⁺, CD95⁺ и HLA-DR⁺ после приема БАД «Фуколам» показатели снижались до нормы, в подгруппе с исходно средними значениями – не менялись. В подгруппе с исходно низким уровнем активированных лимфоцитов после приема «Фуколама» наблюдался его подъем (рис. 1). У пациентов контрольной группы подобной закономерности не выявлено: показатели содержания активированных лимфоцитов CD25⁺, CD95⁺ и HLA-DR⁺ не изменились (рис. 2). Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови (с учетом их исходного уровня) после терапии значимо не изменился ни в основной, ни в контрольной группах, поскольку он изначально находился в пределах средненормальных значений.

Обсуждение полученных данных. Полученные нами результаты отличаются от некоторых данных литературы, свидетельствующих о наличии иммунодефицита при ХВГ С [6, 12]. Однако в последнее время стали появляться сведения, указывающие на

отсутствие изменений субпопуляционного состава лимфоцитов у пациентов с этим заболеванием [1, 7]. В то же время в последних работах описываются изменения, связанные с нарушением процессов активации клеток иммунной системы. К основным маркерам активации относятся антигены CD69, CD25, CD71, HLA-DR, CD95, которые отвечают за прохождение определенных этапов дифференцировки Т-лимфоцитов до активационного апоптоза. Рецепторы к интерлейкину-2 (CD25) и трансферрину (CD71) появляются на мембране Т-лимфоцитов в G₁-стадии клеточного цикла, их экспрессия необходима для перехода этих клеток из G₁ в S-стадию и последующей пролиферации. HLA-DR экспрессируются на поверхности Т-лимфоцитов в течение S-фазы клеточного цикла или после нее [11]. Оценка функционирования системы клеточного иммунитета выявила изменения, указывающие на нарушение процессов активации лимфоцитов у пациентов с ХВГ С. Так, сниженный уровень экспрессии CD25 свидетельствует о недостаточности активации Т-лимфоцитов, играющих важную роль в элиминации вируса, что может быть причиной усиления активности воспалительного процесса и развития иммунодефицитного состояния [8].

Мембранная молекула Fas (CD95) является специализированным рецептором сигналов к индукции апоптоза. Естественным лигандом для Fas-рецептора служит Fas-лиганд, экспрессирующийся на части клеток под влиянием активации. Связывание Fas-рецептора с Fas-лигандом активирует интрацеллюлярные «домены

смерти» этого рецептора и ряд посредников, включая церамиды, протеиновые тирозинкиназы, цистеиновые протеазы, которые каскадно проводят апоптотический сигнал, что ведет к фрагментации ДНК, разрушению цитоскелета, нарушению функционирования митохондрий и, соответственно, к гибели клетки [11]. Считают, что одной из причин повышения экспрессии на лимфоцитах рецептора CD95 при ХВГ С может быть персистенция вируса в клетках лимфоидной системы [15]. Выявленное нами усиление экспрессии CD95 на поверхности клетки указывает на ее готовность к апоптозу и тем самым может явиться фактором (при условии реализации апоптоза), обеспечивающим развитие активационно-индуцированного иммунодефицита. Несмотря на то, что состояние пациентов с нормальным содержанием CD3⁺-лимфоцитов может расцениваться как относительная компенсация, повышенный уровень экспрессии CD95 позволяет отнести их в группу риска по развитию активационно-индуцированного иммунодефицита.

Повышенный уровень экспрессии «позднего» активационного маркера HLA-DR на поверхности лимфоцитов периферической крови у пациентов с ХВГ С также свидетельствует о хронической Т-клеточной активации в условиях персистирования вируса.

Полученные нами результаты по оценке эффективности применения биологически активной добавки «Фуколам» в комплексном лечении пациентов с ХВГ С подтверждают данные литературы об иммуномодулирующем эффекте фукоидана из *Fucus evanescens*, проявляющемся в отношении измененных показателей иммунного статуса и не оказывающем влияния на показатели, находящиеся в пределах нормальных значений [2, 3].

Выводы

1. Изменения показателей иммунного статуса у пациентов с гепатитом С свидетельствуют о хронической Т-клеточной активации при персистенции вируса.

2. Фукоидан из *Fucus evanescens*, входящий в состав биологически активной добавки «Фуколам», оказывает регулирующее действие на уровень активационных антигенов, зависящее от их исходных значений: повышает, если показатели были снижены, снижает, если показатели были высокими, и не изменяет, если они находились в пределах средне-нормальных значений.

3. Фукоидан из бурой морской водоросли *Fucus evanescens* может быть рекомендован для коррекции функциональной активности Т-лимфоцитов у пациентов с ХВГ С.

Работа поддержана грантом РФФИ № 09-04-00761-а и программой фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», совместным грантом СО РАМН – ДВО РАН «Новые иммуномодуляторы на основе морских природных соединений, включая их производные для БАД и лекарственных препаратов» ИП-05-206р-7.

Литература

1. Амбалов Ю.М., Романова Е.Б., Дубинина Н.В. и др. Изучение активационных маркеров лимфоцитов в крови при хроническом гепатите С // Успехи совр. естествознания. 2003. № 11. С. 40.
2. Запорожец Т.С. Клеточные и молекулярные механизмы иммуномодулирующего действия биополимеров морских гидробионтов: дис. ... д-ра мед. наук. Владивосток, 2006. 355 с.
3. Кузнецова Т.А., Запорожец Т.С., Беседнова Н.Н. и др. Иммуностимулирующая и антикоагулянтная активность фукоидана из бурой водоросли Охотского моря *Fucus evanescens* // Антибиотики и химиотерапия. 2003. Т. 48, №4. С. 11–13.
4. Кузнецова Т.А., Шевченко Н.М., Звягинцева Т.Н. и др. Биологическая активность фукоиданов из бурых водорослей и перспективы их применения в медицине // Антибиотики и химиотерапия. 2004. Т.49, № 5. С. 24–30.
5. Наровлянский А.Н., Дерябин П.Г., Вершинина М.Ю. и др. Влияние индукторов интерферона на инфекцию, вызванную вирусом гепатита С и активность мРНК цитокинов в культурах клеток SW-13 и MT-4 // Вопр. вирусол. 2002. № 6. С. 17–21.
6. Наследникова И.О., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В. и др. Дисбаланс иммунорегуляторных Th1- и Th2-цитокинов при персистентных вирусных инфекциях // Мед. иммунол. 2007. Т. 9, № 1. С. 53–60.
7. Никитин В.Ю. Иммунопатогенез и иммунологические критерии прогрессирования хронического вирусного гепатита С: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. СПб., 2007. 42 с.
8. Никитин В.Ю., Сухина И.А., Гусев Д.А. и др. Экспрессия активационных маркеров лимфоцитов у больных хроническим гепатитом С // Мед. иммунол. 2003. Т. 5, № 3–4. С. 311.
9. Смолин В.А. Математическое моделирование в геологии и геофизике. Статистика: учебное пособие. Владивосток: Изд-во ДВГТУ, 2007. 232 с.
10. Соринсон С.Н. Вирусные гепатиты. СПб.: Теза, 1998. 325 с.
11. Ярилин А.А. Основы иммунологии. М.: Медицина, 1999. 602 с.
12. Blackard J., Shata M., Shire N. et al. Acute Hepatitis C Virus Infection: A Chronic Problem // Hepatology. 2008. Vol. 47 (1). P. 321–331.
13. Boyer N., Marcellin P. Pathogenesis, diagnosis and management of hepatitis C // J. Hepatol. 2000. Vol. 32. P. 98–112.
14. Lee J., Hayashi K., Maeda M. et al. Antiherpetic activities of sulfated polysaccharides from green algae // Planta Med. 2004. Vol. 70, No. 9. P. 813–817.
15. Taya N., Torimoto Y., Shindo M. et al. Fas-mediated apoptosis of peripheral blood mononuclear cells in patients with hepatitis C // Br. J. Haematol. 2000. Vol. 110 (1). P. 89–97.

Поступила в редакцию 24.02.2010.

FUNCTIONAL ACTIVITY OF LYMPHOCYTES IN PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH CHRONIC VIRAL HEPATITIS C IN CASE OF COMPREHENSIVE TREATMENT WITH FUCUS EVANESCENS-DERIVED FUCOIDAN

N.V. Filonova¹, T.S. Zaporozhets¹, S.A. Ermolitskaya², L.V. Lebedeva², I.A. Pozhidaeva², T.N. Zvyagintseva³, M.I. Kusaikin³
Research Institute of Epidemiology and Microbiology, SB RAMS (1 Selskaya St. Vladivostok 690087 Russia), Municipal Clinical Infectious Disease Hospital No.1 (19 Krygina St. Vladivostok 690043 Russia), Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS (159 100 Anniv. of Vladivostok Av. Vladivostok 690022 Russia)
Summary – The authors have conducted comparative analysis of main sub-populations of lymphocytes in peripheral blood and markers of their activation in patients with chronic viral hepatitis C, the treatment of whom included fucoidan in the composition of a dietary supplement Fucolam, and patients undergone the baseline therapy. The fucoidan had corrective effect on lymphocyte activation indices. The dietary supplement Fucolam is recommended to be used for comprehensive treatment of chronic viral hepatitis C.
Key words: chronic viral hepatitis C, fucoidan, cell immunity.

Pacific Medical Journal, 2010, No. 3, p. 55–58.