

ЭФФЕКТИВНОСТЬ РОНКОЛЕЙКИНА® В ЛЕЧЕНИИ ХРОНИЧЕСКИХ РЕЦИДИВИРУЮЩИХ ИНФЕКЦИЙ

Желтова О.И., Старостина Н.М., Тихонова М.А.,
Леплина О.Ю., Черных Е.Р., Останин А.А.

НИИ клинической иммунологии СО РАМН, г. Новосибирск

Резюме. Исследовали клиническую и иммунокорректирующую эффективность монотерапии Ронколейкином® (IL-2) в режиме подкожных инъекций или ингаляций в лечении больных с хроническими рецидивирующими инфекциями. Показано, что 3-кратное введение Ронколейкина® в суммарной дозе 1,5 мг сопровождается усилением активности Th1-лимфоцитов и снижением уровня продукции IL-10 *in vitro*, и не приводит к развитию побочных, иммуотропных эффектов, связанных с количественной экспансией Treg. В целом по группе позитивный клинический эффект был зарегистрирован в 65% случаев (у 26/40 больных). Продолжительность клинического эффекта варьировала от 3 до 7 мес, составляя в среднем $4,4 \pm 0,2$ мес. Ингаляционный режим иммунотерапии Ронколейкином® не уступает по своей эффективности традиционному, подкожному варианту введения препарата (70 и 60% позитивного ответа, соответственно), и позволяет статистически более значимо увеличить продолжительность ремиссии основного заболевания.

Ключевые слова: баланс цитокинов, регуляторные T-клетки, цитокиноterapia, IL-2, рецидивирующие инфекции.

Zhelтова O.I., Starostina N.M., Tikhonova M.A., Leplina O.Yu., Chernykh E.R., Ostanin A.A.

EFFICIENCY OF RONCOLEUKIN® IN TREATMENT OF CHRONIC RECURRENT INFECTIONS

Abstract. Clinical and immunocorrective efficiency of Roncoleukin® (IL-2) monotherapy applied as subcutaneous injections versus inhalatory mode of treatment, was studied in patients with chronic recurrent infections. It was shown that administration of Roncoleukin® at a total dose of 1.5 mg was accompanied by increased activity of Th1 lymphocytes and reduced *in vitro* production of IL-10, and does not exert any adverse immunotropic effects associated with Treg expansion. In general, the positive clinical effect was registered in 65% (26/40) of the patients, and its duration ranged between 3 and 7 months (a mean of 4.4 ± 0.2 months). Clinical efficiency of Roncoleukin® inhalations proved to be not inferior to conventional Roncoleukin® immunotherapy performed by subcutaneous injections (resp., 70 and 60% of positive responses), and allows a more significant prolongation of event-free remission. (*Med. Immunol.*, 2011, vol. 13, N 2-3, pp 227-236)

Keywords: cytokine balance, regulatory T-cells, cytokine therapy, IL-2, recurrent infections.

Введение

Несмотря на успехи, достигнутые в лечении и профилактике инфекционных заболеваний, вызванных бактериальной, вирусной или грибковой микрофлорой, увеличивается число тяжелых форм, а также форм с торпидным течением воспалительного процесса, частыми рецидива-

ми и малой эффективностью от адекватной этиотропной терапии.

Длительная персистенция патогенов находится в тесной причинно-следственной взаимосвязи с развитием вторичного иммунодефицита (ВИД), который проявляется снижением иммунной реактивности [5, 4, 6, 10, 12]. Принято считать, что в таких случаях для индукции эффективного противоинфекционного иммунитета и элиминации патогена необходимо проводить иммуностимулирующую терапию. Однако не исключено, что нарушение специфического иммунного ответа может быть следствием активации регуляторных T-клеток (Treg), и в этом случае иммуностимуля-

Адрес для переписки:

Желтова Ольга Игоревна,
НИИ клинической иммунологии СО РАМН
630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: (383) 228-28-57.
E-mail: ct_lab@mail.ru

ция может потенцировать их супрессорную активность [2, 14, 15].

Иммунные нарушения при рецидивирующих инфекционных заболеваниях не всегда удается четко верифицировать «рутинными» методами оценки иммунного статуса. В связи с этим в данной группе пациентов остается открытым вопрос о проведении патогенетически обоснованной иммуотропной терапии. Для ответа на этот вопрос актуальным является проведение углубленных иммунологических исследований с привлечением современных методов, позволяющих оценивать функциональную активность иммунокомпетентных клеток, характер продукции Th1/про- и Th2/противовоспалительных цитокинов, а также количество различных субпопуляций Treg. Такой подход позволит получить новые данные об особенностях иммунопатогенеза хронических рецидивирующих инфекций, которые послужат научной основой для разработки более эффективных методов лечения часто и длительно болеющих (ЧДБ) пациентов.

Поиск и клиническая апробация новых иммунотерапевтических подходов в лечении ЧДБ пациентов с бактериальной или вирусной инфекцией является актуальной научно-практической задачей, решение которой необходимо для повышения эффективности терапии, улучшения прогноза заболевания и качества жизни больного. В современной медицинской практике все более активно используются препараты, основой которых являются цитокины. Одним из первых отечественных фармакопейных препаратов, относящихся к этой группе, является Ронколейкин — рекомбинантный интерлейкин-2 (IL-2) человека. Многолетний опыт применения Ронколейкина при лечении сепсиса, острых гнойно-воспалительных заболеваний, некоторых злокачественных опухолей свидетельствует о его эффективности и безопасности [1, 7, 8, 9, 11]. Тем не менее остается открытым ряд вопросов. В частности, в отношении ЧДБ пациентов не исследована клиническая и иммунокорригирующая эффективность Ронколейкина при его использовании в режиме монотерапии при различных способах введения препарата: в виде подкожных инъекций или в виде ингаляций. Кроме того, представляется важным ответить на вопрос: не происходит ли на фоне курсового лечения Ронколейкином экспансии регуляторных супрессорных Т-клеток, что может быть отнесено к побочным, иммуотропным эффектам препарата, поскольку может усилить клинические проявления иммунной недостаточности [13, 16]. Для решения этих задач в период с 2009 по 2010 гг. были организованы и проведены открытые рандомизированные сравнительные исследования

в параллельных группах по оценке эффективности Ронколейкина при различных режимах введения у ЧДБ пациентов с хроническими рецидивирующими инфекциями.

Материалы и методы

По разработанному протоколу было пролечено 42 ЧДБ пациентов: 58,6% (33/42) женщин и 21,4% (9/42) мужчин. В работу включались больные в возрасте от 18 до 60 лет с бактериальной (хронический бронхит, хронический тонзиллит, пиодермия) или вирусной (аденовирусной, герпетической) инфекцией, с частотой рецидивов основного заболевания ≥ 6 раз/год. Обязательным условием являлось наличие подписанного больным информированного согласия на участие в исследовании.

Ронколейкин использовали в виде монотерапии. В первой группе ($n = 21$) препарат вводили в виде подкожных инъекций (в дозе 0,5 мг, № 3 через день), во второй группе ($n = 21$) — в виде ингаляций (Ронколейкин в дозе 0,5 мг, разведенный в 7–8 мл раствора для инъекций, № 3 через день). На период проведения иммунотерапии и в течение всего периода последующей ремиссии не допускалось применение других цитокин-содержащих или иммунокорригирующих препаратов.

Основным критерием оценки клинической эффективности иммунотерапии являлась продолжительность безрецидивного периода, а также частота обострений у больных со сроком наблюдения 6 и более месяцев (по данным катамнеза 40 из 42 пролеченных больных).

Сформированные на основании критериев включения/исключения подгруппы были сопоставимы по полу, возрасту, основным нозологическим формам и длительности заболевания, а также по частоте рецидивов и средней продолжительности межрецидивного периода (табл. 1).

Иммунологическое обследование больных проводили до начала и через 48 ч после окончания курса иммунотерапии. Общий анализ крови оценивали на гемоанализаторе «HEMA-Screen 13» (Швейцария-Италия). Мононуклеарные клетки (МНК) получали центрифугированием гепаринизированной венозной крови в градиенте плотности фикола-верографина. Для стимуляции клеток использовали растворимые моноклональные анти-CD3-антитела (ICO-90, «Медбиоспектр» Москва) в концентрации 1 мкг/мл. Интенсивность спонтанной и анти-CD3-индуцированной пролиферации оценивали через 72 ч по включению ЗН-тимидина.

В параллельных 48-часовых культурах оценивали уровень спонтанной и анти-CD3-стимулированной продукции цитокинов. Кон-

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЧДБ ПАЦИЕНТОВ В ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУППАХ

Показатель	П/к введение, n = 21	Ингаляции, n = 21
Мужчины/женщины	5/16 (23,8/76,2%)	4/17 (19/81%)
Средний возраст (min-max)	31,2±1,8 (21-55)	30,2±2,5 (18-57)
Вирусные инфекции	71,4% (15/21)	71,4% (15/21)
Герпетическая инфекция	42,8% (9/21)	57,1% (12/21)
Аденовирусная инфекция	28,6% (6/21)	14,3% (3/21)
Бактериальные инфекции	28,6% (6/21)	28,6% (6/21)
Хронический тонзиллит	4,8% (1/21)	9,6% (2/21)
Хронический бронхит	4,8% (1/21)	—
Пиодермия/фурункулез	19,0% (4/21)	19,0% (4/21)
Длительность заболевания (лет)	7,4±1,6	7,8±1,3
Частота рецидивов / в год	9,8±0,6	11,1±1,3
Межрецидивный период (мес)	1,3±0,1	1,3±0,1

центрацию $IFN\gamma$, $IL-4$, $TNF\alpha$ и $IL-10$ определяли методом ИФА в соответствии с инструкцией фирмы-производителя («Протеиновый контур», СПб для $IL-4$ и «Вектор-Бест», Новосибирск для $IFN\gamma$, $TNF\alpha$ и $IL-10$). Методом проточной цитофлюориметрии (FACSCalibur, Becton Dickinson), используя соответствующие моноклональные антитела («Сорбент», Москва), определяли содержание различных субпопуляций лимфоцитов ($CD3^+$, $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток, $CD20^+$ В-клеток, общей популяции $CD16^+$ НК-клеток и активированных $CD56^+$ $CD16^+$ НК-клеток), а также моноцитов, экспрессирующих HLA-DR антигены. Относительное количество фагоцитирующих гранулоцитов и моноцитов оценивали методом проточной цитометрии после инкубации выделенных клеток с латексом, меченным FITC. В сыворотке крови определяли содержание иммуноглобулинов основных трех классов (IgG, IgM и IgA).

Относительное содержание $CD4^+$ $CD25^+$ и $CD4^+$ $CD25^{high}$ Т-клеток оценивали методом проточной цитофлюориметрии с использованием PE-меченных анти-CD4-антител («Сорбент», Москва) и FITC-меченных анти-CD25-антител (BD PharMingen, США). Для оценки внутриклеточной экспрессии FoxP3 в $CD4^+$ и в $CD8^+$ Т-клетках, МНК обрабатывали FITC-меченными анти-CD4- или анти-CD8-антителами («Сорбент», Москва). Пермеабиллизацию клеток проводили с использованием 0,2% раствора Твин-20, после чего клетки культивировали 30 мин с PE-меченными анти-FoxP3-антителами (eBioscience, США).

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета программ Statistica 6.0 для Windows. Для выявления значимых различий сравниваемых показателей использовали непараметрический U-критерий Вилкоксона—Ман-

на—Уитни, а также W-критерий Вилкоксона для связанных выборок. Достоверность различия частоты встречаемости признака определяли, используя точный метод Фишера (pTМФ). Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Оценка параметров иммунитета ЧДБ пациентов в динамике иммунотерапии

Ранее нами было показано, что ЧДБ пациенты характеризуются количественным дефицитом активированных $CD56^+$ $CD16^+$ НК-клеток, повышенным содержанием $CD4CD25^{high}$ и $CD4FoxP3$ Treg, сдвигом Th1/Th2 баланса в сторону Th2-клеток, секретирующих $IL-4$, а также повышенной активностью Т-клеток, секретирующих $IL-10$ (индуцибельные Treg?) [3]. Выявленные нами факты свидетельствуют о нарушениях механизмов врожденного (дефицит НК-клеток) и приобретенного иммунитета (сдвиг Th1/Th2), которые развиваются на фоне количественной экспансии регуляторных супрессорных Т-клеток и могут являться патогенетической основой персистенции и хронизации инфекции.

Поэтому представлялось важным оценить иммунокорректирующий эффект иммунотерапии Ронколейкином. Из данных таблицы 2 видно, что у ЧДБ пациентов, получивших курсовое лечение Ронколейкином как в режиме подкожных инъекций, так и в режиме ингаляций, основные параметры Т-, В-клеточного и моноцитарно-фагоцитарного звеньев иммунитета не претерпевали каких-либо выраженных изменений и сохранялись на уровне донорских значений. Следует отметить, что повышенное содержание $CD4$ Т-клеток и количественный дефицит активированных $CD16CD56$ НК-клеток, которые исходно обнаруживались у ЧДБ пациентов, сохра-

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ ИММУННОГО СТАТУСА ЧДБ ПАЦИЕНТОВ В ДИНАМИКЕ ПРОВОДИМОЙ ИММУНОТЕРАПИИ

Показатель	Доноры	Режимы иммунотерапии Ронколейкином			
		п/к введение (n = 21)		Ингаляции (n = 21)	
		До ИТ	После ИТ	До ИТ	После ИТ
Абс. лимфоцитоз ($\times 10^9/\text{л}$)	1,87 \pm 0,14	2,16 \pm 0,12*	2,07 \pm 0,14	2,27 \pm 0,16*	2,32 \pm 0,16*
CD3 Т-лимфоциты (%)	76,1 \pm 1,48	79,86 \pm 1,36	78,38 \pm 1,15	77,81 \pm 1,53	78,62 \pm 1,44
CD4 Т-лимфоциты (%)	45,32 \pm 0,93	47,33 \pm 2,18	48,67 \pm 1,01*	49,0 \pm 1,27 *	50,81 \pm 1,85*
CD8 Т-лимфоциты (%)	29,94 \pm 1,24	33,9 \pm 1,67	29,95 \pm 1,52	29,14 \pm 1,61	27,43 \pm 1,3
CD4/CD8	1,62 \pm 0,05	1,52 \pm 0,13	1,76 \pm 0,14	1,84 \pm 0,16	1,9 \pm 0,17
CD20 В-клетки (%)	9,58 \pm 0,86	9,19 \pm 1,23	10,05 \pm 1,1	10,14 \pm 1,28	8,67 \pm 0,7
CD16 NK-клетки (%)	14,17 \pm 1,67	11,05 \pm 0,76	10,86 \pm 1,0	13,29 \pm 1,34	12,57 \pm 1,42
CD16CD56 NK-клетки (%)	10,88 \pm 0,64	4,95 \pm 0,5*	5,1 \pm 0,51*	6,71 \pm 0,72*	6,24 \pm 0,77*
HLA-DR моноциты (%)	62,8 \pm 4,3	66,6 \pm 2,2	65,3 \pm 3,1	67,3 \pm 2,4	65,7 \pm 2,7
Фагоцитоз моноцитов	57, 9 \pm 1,05	54,57 \pm 1,97	53,7 \pm 1,43	55,59 \pm 1,596	54,62 \pm 2,13
Фагоцитоз гранулоцитов	65,1 \pm 1,3	64,14 \pm 1,64	65,57 \pm 2,32	68,0 \pm 1,88	67,14 \pm 2,81
Иммуноглобулин G, г/л	13,0 \pm 0,56	12,32 \pm 0,62	11,86 \pm 0,53	12,27 \pm 0,61	12,11 \pm 0,55
Иммуноглобулин M, г/л	1,95 \pm 0,13	2,22 \pm 0,2	2,12 \pm 0,16	2,04 \pm 0,17	1,93 \pm 0,16
Иммуноглобулин A, г/л	1,88 \pm 0,11	2,17 \pm 0,14	2,125 \pm 0,159	2,13 \pm 0,185	2,07 \pm 0,2
Пролиферация (имп/мин)					
Спонтанная	234 \pm 32,6	438 \pm 132	242 \pm 33	227 \pm 55	187 \pm 20
анти-CD3-индуцированная	23760 \pm 2799	26542 \pm 2161	24817 \pm 2097	19592 \pm 2097	2237 \pm 1860
ИБ _{CD3}	139,8 \pm 20,7	129,9 \pm 23,4	132,1 \pm 17,6	128,8 \pm 28,1	145 \pm 18,6

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

нялись также и после окончания иммунотерапии.

Исследование уровня спонтанной продукции цитокинов не выявила значимых различий между больными, получавшими Ронколейкин в режиме подкожных инъекций или ингаляционно (табл. 3). Видно, что через 48 ч после последнего введения препарата в нестимулированных культурах МНК больных сохранялась повышенная активность Т-клеток, секретирующих IL-4 и IL-10. Тем не менее следует отметить, что после курсового подкожного введения Ронколейкина Т-клетки ЧДБ пациентов в ответ на анти-CD3-стимуляцию секретируют IFN γ на уровне 2-кратно превышающем донорские значения (4584 \pm 315 против 2135 \pm 951 пкг/мл, $p_U < 0,05$). Эти данные свидетельствуют об усилении функциональной реактивности Th1-лимфоцитов на фоне проводимой терапии, хотя различия с исходным уровнем и не были статистически достоверными (4584 \pm 315 против 3960 \pm 450 пкг/мл, $p_U = 0,14$).

В подгруппе больных с ингаляционным введением Ронколейкина не отмечалось дополнительного прироста активности Th1-клеток, секретирующих IFN γ в ответ на анти-CD3-стимуляцию. Тем не менее регистрировалось ослабление анти-

CD3-индуцированной продукции IL-10, в результате чего различия в уровне секреции IL-10 становились статистически недостоверными по сравнению с аналогичными показателями здоровых доноров.

В целом исследования цитокинового статуса показывают, что уже через 48 ч после завершения иммунотерапии в культурах анти-CD3-стимулированных Т-лимфоцитов ЧДБ пациентов регистрируется отчетливая тенденция на усиление активности Th1-лимфоцитов (при подкожном введении Ронколейкина) и снижение уровня продукции IL-10 (при ингаляционном пути введения препарата). При условии сохранения выявленного нами тренда, такие изменения цитокинового статуса могут иметь клиническое значение в плане ослабления общего иммуносупрессорного фона и усиления Th1-ответа, направленного против патогенов бактериальной или вирусной природы.

Одной из задач исследования являлась проверка гипотезы, что курсовое лечение с использованием pIL-2 может сопровождаться развитием побочных иммунотропных эффектов, связанных с экспансией Treg, высоко экспрессирующих рецепторы для IL-2 (CD4CD25^{high} Treg). Это задача приобретала еще большее значение, поскольку

ТАБЛИЦА 3. ЦИТОКИНОВЫЙ СТАТУС ЧДБ ПАЦИЕНТОВ В ДИНАМИКЕ ПРОВОДИМОЙ ИММУНОТЕРАПИИ

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

Примечание. * – $p_U < 0,05$; ** – $p_U < 0,01$ – достоверность различий по сравнению с донорами (U критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

нами было установлено, что ЧДБ пациенты (особенно, с вирусными инфекциями) исходно характеризуются повышенным содержанием различных субпопуляций супрессорных Т-клеток (CD4CD25^{high} Treg, CD4FoxP3 Treg) [3].

Сравнительный анализ компартмента Treg у ЧДБ пациентов, получивших лечение в виде подкожных инъекций Ронколейкина, показал снижение относительного и абсолютного количества CD4CD25^{high} Treg через 48 ч после завершения курса иммунотерапии (табл. 4), тогда как содержание CD4FoxP3 Treg сохранялось на исходно повышенном уровне. В подгруппе ЧДБ больных с ингаляционным режимом иммунотерапии содержание CD4CD25^{high} Т-клеток оставалось в границах нормативных значений. При этом регистрировалось отчетливое снижение относительного и абсолютного количества

CD4FoxP3 Treg до уровня, при котором различия с донорами становились статистически недостоверными.

Поскольку повторное обследование проводилось через 48 ч после завершения иммунотерапии, существовала потенциальная возможность отсроченной во времени экспансии Treg. Чтобы исключить такую вероятность, провели оценку относительного и абсолютного количества CD4CD25^{high} Treg на 7 сут после завершения иммунотерапии. Из данных рисунка 1 видно, что и на более поздних сроках после окончания курсового лечения Ронколейкином содержание CD4CD25^{high} Treg в периферической крови ЧДБ больных значимо не отличается от нормативных значений здоровых доноров. Таким образом, можно заключить, что иммунотерапия Ронколейкином в курсовой дозе 1,5 мг не сопровождалась

ТАБЛИЦА 4. СУБПОПУЛЯЦИИ Treg В ДИНАМИКЕ ПРОВОДИМОЙ ИММУНОТЕРАПИИ ЧДБ ПАЦИЕНТОВ

Показатель	Доноры	Режимы иммунотерапии Ронколейкином			
		п/к введение (n = 21)		Ингаляции (n = 21)	
		До ИТ	После ИТ	До ИТ	После ИТ
CD4CD25 Treg (%)	5,0 \pm 0,28	5,0 \pm 0,4	4,31 \pm 0,41	5,78 \pm 0,53	4,93 \pm 0,39
CD4CD25 ^{high} Treg (%)	1,31 \pm 0,12	1,74 \pm 0,17*	1,48 \pm 0,29	1,52 \pm 0,16	1,55 \pm 0,27
CD4FoxP3 Treg (%)	3,03 \pm 0,29	5,75 \pm 0,94*	6,9 \pm 0,92*	5,0 \pm 0,86*	4,23 \pm 0,89
CD8FoxP3 Treg (%)	6,88 \pm 1,8	6,63 \pm 1,52	5,8 \pm 1,18	4,1 \pm 0,98	3,6 \pm 1,035
CD4CD25-Treg ($\times 10^9$ /л)	0,09 \pm 0,0064	0,11 \pm 0,011	0,09 \pm 0,014	0,13 \pm 0,015	0,11 \pm 0,01
CD4CD25 ^{high} Treg ($\times 10^9$ /л)	0,025 \pm 0,0025	0,04 \pm 0,004*	0,03 \pm 0,005	0,034 \pm 0,004	0,039 \pm 0,007
CD4FoxP3 Treg ($\times 10^9$ /л)	0,06 \pm 0,018	0,125 \pm 0,019*	0,133 \pm 0,02*	0,112 \pm 0,018*	0,098 \pm 0,017
CD8FoxP3 Treg ($\times 10^9$ /л)	0,11 \pm 0,02	0,145 \pm 0,035	0,12 \pm 0,03	0,09 \pm 0,021	0,075 \pm 0,015

Примечание. * – $p_U < 0,05$ – достоверность различий по сравнению с донорами.

ждается развитием побочных, иммуотропных эффектов, связанных с количественной экспансией различных субпопуляций регуляторных супрессорных Т-клеток.

Клиническая эффективность

Характер клинического ответа ЧДБ пациентов на иммунотерапию классифицировали по 3 категориям: 1 — положительный эффект (уменьшение числа рецидивов; увеличение продолжительно-

сти межрецидивного периода; уменьшение площади поражения (у больных герпесом, пиодермией/фурункулезом) и выраженности клинических проявлений; 2 — без эффекта (отсутствие изменений в частоте рецидивов и продолжительности межрецидивного периода до и после лечения); 3 — негативный эффект (увеличение числа рецидивов и сокращение межрецидивного пе-

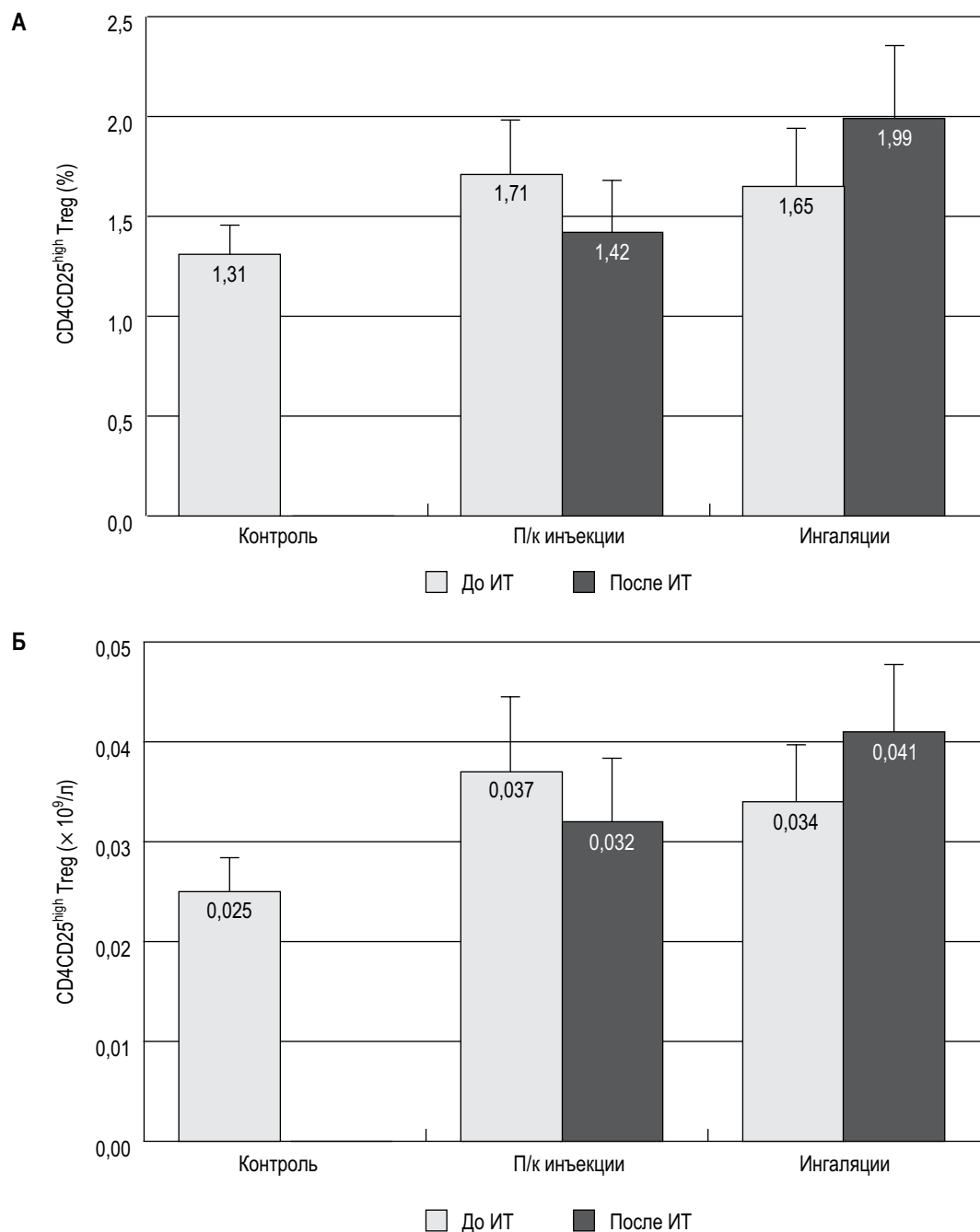


Рисунок 1. Содержание CD4CD25^{high} Treg в крови ЧДБ пациентов до и через 7 сут после иммунотерапии

Примечание. Представлены средние значения ($M \pm S.E.$) относительного (А) и абсолютного (Б) количества CD4CD25^{high} Treg в периферической крови ЧДБ пациентов динамике иммунотерапии при подкожном ($n = 11$) и ингаляционном ($n = 11$) режиме введения Ронколейкина.

риода, увеличение площади поражения, тяжести обострений).

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

В 35% случаев (14/40) иммунотерапия была проведена без значимого эффекта. Клинического ухудшения (негативного эффекта) после лечения Ронколейкином не было зарегистрировано ни у одного больного.

Из данных рисунка 2 видно, что позитивный клинический эффект был достигнут у 60% (12/20) пациентов при подкожном пути введения препарата, и у 70% (14/20) больных – при использовании ингаляций. Более высокая эффективность ингаляционного режима не была статистически значимой из-за малого числа наблюдений ($P_{\text{ТМФ}} = 0,37$). Тем не менее результаты клиниче-

ских испытаний четко свидетельствуют, что ингаляционный режим иммунотерапии у больных с хроническими, рецидивирующими инфекциями не уступает по своей эффективности традиционному, подкожному варианту введения Ронколейкина.

Учитывая этот факт, дополнительно проанализировали эффективность иммунотерапии (независимо от пути введения препарата) в подгруппах ЧДБ пациентов с вирусной и бактериальной инфекцией (рис. 2). Положительный клинический эффект регистрировался у 71,4% (20/28) больных с рецидивирующими, вирусными инфекциями, тогда как при хронических инфекционных заболеваниях бактериальной природы – только в 50% (6/12) случаев. Несмотря на то, что эти различия также не являлись статистически значимыми ($P_{\text{ТМФ}} = 0,17$), тем не менее они представляются очень важными, поскольку ранее нами было показано, что именно пациенты с вирусными инфекциями характеризуются более выраженными иммунными нарушениями [3].

В целом по группе ЧДБ пациентов, ответивших на проведенную иммунотерапию, продолжительность межрецидивного периода до начала лечения составляла в среднем $1,2 \pm 0,09$ мес (табл. 5). Временной интервал до развития 1-го

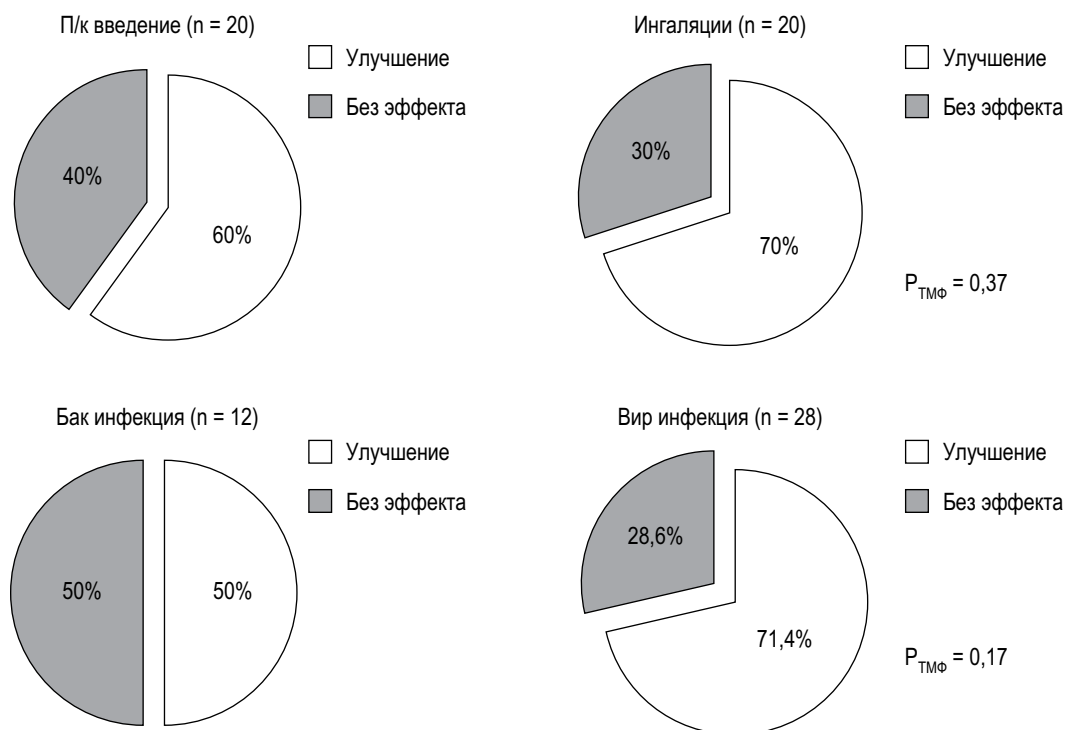


Рисунок 2. Клиническая эффективность иммунотерапии ЧДБ пациентов

Примечание. Результаты лечения ЧДБ больных (позитивный ответ и отсутствие эффекта) представлены в зависимости от режима введения препарата (п/к введение vs ингаляции), а также от природы этипатогена (бактериальная vs вирусная инфекция).

$P_{\text{ТМФ}}$ – достоверность различия частот, посчитана точным методом Фишера.

ТАБЛИЦА 5. ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ МЕЖРЕЦИДИВНОГО ПЕРИОДА У ЧДБ ПАЦИЕНТОВ, ОТВЕТИВШИХ НА ИММУНОТЕРАПИЮ РОНКОЛЕЙКИНОМ

Межрецидивный период (мес)	До ИТ	После ИТ	P _w
В целом по группе (n = 26)	1,2±0,09	2,6±0,3	0,0004
Варианты иммунотерапии			
П/к введение (n = 12)	1,2±0,09	2,1±0,3	0,015
Ингаляции (n = 14)	1,2±0,15	3,1±0,6	0,0097
Нозологические формы			
Вирусная инфекция (n = 20)	1,2±0,1	2,6±0,3	0,00036
Бактериальная инфекция (n = 6)	1,3±0,19	2,6±1,1	0,144

Примечание. Представлена средняя продолжительность межрецидивного периода (за год) до и после иммунотерапии (до развития 1-го рецидива). P_w – непараметрический критерий Вилкоксона для связанных выборок.

рецидива после окончания терапии Ронколейкином варьировал от 0,5 до 7 мес, составляя в среднем 2,6±0,3 мес (P_w = 0,0004). При этом большинство больных отмечали, что даже в случае раннего рецидивирования заболевания, последующих обострений не было в течение 5–7 мес.

В подгруппах ЧДБ пациентов, ответивших на иммунотерапию в виде подкожных инъекций и ингаляций, первое после лечения обострение заболевания происходило в среднем через 2,1±0,3 и 3,1±0,6 мес соответственно. Таким образом, при ингаляционном режиме продолжительность безрецидивного периода была дольше, и статистически более значимо отличалась от исходных значений.

Использование Ронколейкина (0,5 мг, п/к или ингаляционно, № 3 через день) увеличивало безрецидивный период при вирусных инфекциях с 1,2±0,1 до 2,6±0,3 мес (p_w = 0,00036). В подгруппе больных с бактериальными инфекциями первое обострение после иммунотерапии также регистрировалось в среднем через 2,6 мес, но в этом случае различия с исходными значениями межрецидивного периода не были статистически значимыми (p_w = 0,144).

В завершение следует сказать о побочных реакциях, которые были зарегистрированы в нашем исследовании. При подкожном введении препарата практически все больные отмечали местную болезненность различной интенсивности (от 2 до 10 баллов по ВАШ). В отдельных случаях формировалась гиперемизированная папула с местным отеком, которая купировалась самостоятельно в период от нескольких часов до 2 дней. В группе больных с ингаляционным режимом введения Ронколейкина, нежелательные явления на фоне терапии были зарегистрированы у 7/21 пациентов (33,3% случаев). Преимущественно больные жаловались на першение в горле, чихание, ринорею, которые у 6 пациентов купировались самостоятельно в течение 10–15 мин после ингаляции. В одном случае больная жаловалась на за-

труднение дыхания, что потребовало назначения антигистаминных препаратов с хорошим эффектом. Таким образом, можно заключить, что в целом курсовое лечение Ронколейкином по разработанным схемам подкожного и ингаляционного введения переносится ЧДБ пациентами вполне удовлетворительно.

Использование Ронколейкина (0,5 мг, п/к или ингаляционно, № 3 через день) увеличивало безрецидивный период при вирусных инфекциях с 1,2±0,1 до 2,6±0,3 мес (p_w = 0,00036). В подгруппе больных с бактериальными инфекциями первое обострение после иммунотерапии также регистрировалось в среднем через 2,6 мес, но в этом случае различия с исходными значениями межрецидивного периода не были статистически значимыми (p_w = 0,144).

Заключение

В основе любого хронического инфекционно-воспалительного процесса лежат те или иные изменения в иммунной системе, которые и служат одной из ведущих причин персистенции инфекции. Поэтому при наличии хронического инфекционно-воспалительного процесса бактериальной, вирусной или грибковой природы является патогенетически обоснованным проведение иммунотропной терапии.

Результаты проведенных нами клинических испытаний позволяют сделать несколько обобщений. Во-первых, патогенетической основой персистенции и хронизации инфекции у ЧДБ пациентов является активация пула регуляторных Т-клеток, которые поддерживают общий иммуносупрессивный фон в организме больных, что приводит к нарушению механизмов врожденного и приобретенного иммунитета и развитию ВИД. Во-вторых, наличие ВИД обосновывает необходимость использования иммунокорректирующей терапии у ЧДБ пациентов независимо от природы этиопатогена.

С этой целью может быть использован препарат рекомбинантного интерлейкина-2 человека. Нами показано, что 3-кратное введение Ронколейкина в суммарной дозе 1,5 мг в виде подкожных инъекций или ингаляций, через 48 ч после завершения курса иммунотерапии сопровождается отчетливой тенденцией на усиление активности Th1-лимфоцитов и снижение уровня продукции IL-10 *in vitro*.

Иммунотерапия Ронколейкином не сопровождается развитием побочных, иммуотропных эффектов, связанных с количественной экспансией Treg. Напротив, при подкожном режиме введения препарата отмечается снижение относительного и абсолютного числа CD4CD25^{high} Treg до уровня нормы ($p_U < 0,05$). При ингаляционном пути введения препарата содержание CD4CD25^{high} Treg и CD8FoxP3 Treg сохраняется стабильно нормальным, а относительное и абсолютное количество CD4FoxP3 Treg снижается до уровня, при котором различия с донорами становятся статистически недостоверными.

Использование Ронколейкина в режиме иммунотерапии позволяет достичь клинически значимого позитивного эффекта в 65% случаев (у 26/40 ЧДБ пациентов). Лечебный эффект проявляется в виде: уменьшения частоты рецидивов у 12/26 (46,2%) больных; уменьшения площади поражения и выраженности клинических проявлений у 3/26 (11,5%) больных; снижения частоты обострений в сочетании с уменьшением выраженности клинических проявлений у 11/26 (42,3%) пациентов. Продолжительность клинического эффекта варьировала от 3 до 7 мес, составляя в среднем $4,4 \pm 0,2$ мес.

Ингаляционный режим иммунотерапии Ронколейкином не уступает по своей эффективности традиционному, подкожному варианту введения препарата (70 и 60% позитивного ответа соответственно), и позволяет статистически более значимо увеличить продолжительность ремиссии основного заболевания. Иммунотерапия Ронколейкином более эффективна у больных с рецидивирующими вирусными инфекциями (герпес, аденовирусная инфекция), несмотря на то, что именно эти пациенты отличаются более выраженными иммунными дисфункциями.

Список литературы

1. Брискин Б.С., Бубнова Н.А., Громов М.И., Костюченко А.Л., Останин А.А., Петров С.В., Пивоварова Л.П., Ребенок Ж.А., Симбирцев А.С., Толстой А.Д., Черных Е.Р., Шевченко С.М. Ронколейкин в иммунотерапии сепсиса (круглый стол) // Медицинская иммунология. — 2000. — Т. 2, № 4. — С. 447-457.
2. Воробьев А.А., Быковская С.Н., Пашков Е.П., Быков А.С. Роль клеток-регуляторов CD4+CD25+ в развитии хронических инфекционных заболеваний // Вестник РАМН. — 2006. — № 9-10. — С. 24-29.
3. Желтова О.И., Старостина Н.М., Тихонова М.А., Леплина О.Ю., Черных Е.Р., Останин А.А. Особенности иммунитета больных с хроническими рецидивирующими инфекциями // Иммунология. — 2011. (в печати)
4. Жукова О.Б., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В. Вирусная персистенция: иммунологические и молекулярно-генетические аспекты // Бюллетень сибирской медицины. — 2003. — № 4. — С. 113-119. Иммунодефицитные состояния / под ред. Смирнова В.С., Фрейдлин И.С. — СПб.: Фолиант, 2000. — 568 с.
5. Калинина Н.М. Нарушения иммунитета при рецидивирующем фурункулезе // Цитокины и воспаление. — 2003. — Т. 2, № 1. — С. 41-44.
6. Лобзин Ю.В., Козлов В.К., Журкин А.Т. Ронколейкин: иммунотерапия инфекционных заболеваний // Иммунол., аллергол., инфектология. — 2001. — № 2. — С. 19-35.
7. Моисеенко В.М., Новик А.В., Орлова Р.В., Проценко С.А., Михайличенко Т.Д., Семенова А.И., Тюкавина Н.В. Оценка эффективности высоких доз интерлейкина-2 (ронколейкина) у больных диссеминированной меланомой кожи: I-II фазы клинических исследований // Вопросы онкологии. — 2005. — Т. 51, № 5. — С. 546-549.
8. Молчанов О.Е., Карелин М.И., Жаринов Г.М. Современные тенденции применения препаратов рекомбинантного интерлейкина-2 в онкологии // Цитокины и воспаление. — 2002. — Т. 1, № 3. — С. 38-47.
9. Нестерова И.В. Алгоритмы обследования пациентов со вторичными иммунодефицитными состояниями, сопровождающимися ведущим синдромом вирусно-бактериальной инфекции // Int. J. Immunorehabilitation. — 2000. — № 1. — С. 72-86.
10. Останин А.А., Зайнутдинов Ю.Г., Стрельцова Е.И., Овечкин А.В., Агеев Н.Л., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Черных Е.Р. Хирургический сепсис. II. Эффективность иммунотерапии рекомбинантным интерлейкином-2 // Вест. Хирургии. — 2002. — Т. 161, № 4. — С. 79-84.
11. Ahmed R., Morrison L.A., Knipe D.M. Persistence of virus // Fields Virology. — 3d Edition / Ed. by B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley et al. — Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. — 1996. — P. 219-249.
12. Iwashiro M., Messer R.J., Peterson K.E., Stromnes I.M., Sugie T., Hasenkrug K.J. Immunosuppression by CD4+ regulatory T cells

induced by chronic retroviral infection // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2001. — Vol. 98. — P. 9226-9230.

13. Mills K.H. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? // Nat. Rev. Immunol. — 2004. — Vol. 4. — P. 841-855.

14. Mittrucker H.W., Kaufmann S.H. Regulatory T cells and infection: suppression revisited // Eur. J. Immunol. — 2004. — Vol. 34. — P. 306-312.

15. Walther M., Tongren J.E., Andrews L., Korbel D., King E., Fletcher H., Andersen R.F.,

Bejon F., Thompson F., Dunachie S.J., Edele F., de Souza J.B., Sinden R.E., Gilbert S.C., Riley E.M., Hill A.V.S. Upregulation of TGF-beta, FOXP3 and CD4+CD25+ regulatory T cells correlates with more rapid parasite growth in human malaria infection // Immunity. — 2005. — Vol. 23. — P. 287-296.

поступила в редакцию 15.03.2011

принята к печати 25.03.2011