

## Литература

1. Никулкина Е.Н., Крель П.Е., Лопаткина Т.Н. и др. // *Клинич. фармакология и терапия*. — 2004. — Т. 13, №2. — С. 48-52.
2. Amara R., Mareckova H., Urbanek P. et al. // *J. Gastroenterology*. — 2003. — Vol. 38, No. 3. — P. 254.
3. Berg T., Sarrazin C., Herrmann E. et al. // *Hepatology*. — 2003. — Vol. 37. — P. 600-609.
4. Burroughs A.K. // *Liver transpl.* — 2000. — Vol. 6, No. 2. — P. 35-40.
5. Craxi A. // *Semin. Liver Dis.* — 2003. — Vol. 23, No. 1. — P. 35-46.
6. Hadziyannis S.J., Sette Jr H., Morgan T.R. et al. // *Ann. Intern. Med.* — 2004. — Vol. 140. — P. 346-355.
7. Gopal D.V., Rabcin J.M., Berk B.S. et al. // *Liver transpl.* — 2001. — No. 7. — P. 181-190.
8. McHutchison J., Gordon S.C., Schiff E.R. et al. // *N. Engl. J. Med.* — 1998. — Vol. 339. — P. 1485-1492.
9. Meurs E. // *Virologie*. — 1997. — Vol. 1. — P. 481-498.
10. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Management of Hepatitis C: 2002 // *Hepatology*. — 2002. — Vol. 36. — P. 2-20.
11. Peters M. // *Hepatology*. — 1996. — Vol. 23. — P. 909-916.
12. Pestka S. // *Immunological reviews*. — 2004. — Vol. 202. — P. 28-32.
13. Poynard T., McHutchison J., Manns M. et al. // *Gastroenterology*. — 2002. — Vol. 122. — P. 1303-1313.
14. Randall G., Rice C.M. // *Curr. Opin. Infect. Dis.* — 2001. — Vol. 14. — P. 743-747.
15. Wedemeyer H., Cornberg B., Manns M.P. // *Liver Immunology/ed. Gershwin*. — London: Academic Press, 2003. — Ch. 16. — P. 223-248.

Поступила в редакцию 15.02.06.

ESTIMATION OF EFFICIENCY OF ANTIVIRUS THERAPY IN VIEW OF SOME PARAMETERS OF SYSTEM OF CYTOKINES AT CHRONIC HCV-INFECTION

L.F. Sklyar, E. V. Markelova  
Vladivostok State Medical University

Summary — The group of patients in amount 45 person received the standard combined therapy by preparations of recombinant IFN- $\alpha$  in combination with ribavirin. The positive effect of standard antiviral treatment at patients with chronic HCV-infection associated with increase of level of IL-2, decrease of levels of TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-12p40, IL-12p70 and IL-10 in peripheral serum. It has allowed to use them as noninvasive markers of the steady virologic answer during treatment of a chronic HCV-infection.

*Pacific Medical Journal*, 2006, No. 4, p. 31-35.

УДК612.017:616.61-002.151-092

И.Г. Максёма, Т.В. Кушнарева, Р.А. Слонова,  
В.А. Иванис

### ОЦЕНКА ЗНАЧЕНИЯ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ИММУННЫХ КОМПЛЕКСОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ

НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (г. Владивосток),  
Владивостокский государственный медицинский университет

*Ключевые слова:* геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, патогенез, циркулирующие иммунные комплексы.

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) — природно-очаговое вирусное заболевание, широко распространенное на территории России, включая многие регионы европейской части и Дальнего Востока. В дальневосточных очагах ГЛПС регистрируется ежегодно, характеризуется значительной тяжестью и высокой летальностью. В последние годы при изучении этого заболевания были получены доказательства ключевой роли иммунопатологических реакций в его патогенезе [1, 5, 7]. В то же время остаются не до конца решенными вопросы о механизмах отдельных звеньев иммунопатогенеза. В частности, данные о циркулирующих иммунных комплексах, повышенное содержание которых отмечается у больных ГЛПС при различ-

ной тяжести инфекции, разноречивы и не содержат пока окончательного ответа о их роли в патогенезе заболевания [1, 7, 11]. Изучая значение отдельных гуморальных факторов, А.А. Суздальцев [11] и Т.П. Владимирова [1] установили особенности изменения содержания неспецифических циркулирующих иммунных комплексов в зависимости от формы и периода ГЛПС. Однако авторы не определяли размеры комплексов, уточнив патогенетическую роль и диагностическую значимость других показателей. В.Г. Морозов [7] впервые выявил закономерности изменений содержания циркулирующих иммунных комплексов при ГЛПС с учетом их размеров [7]. Однако следует принять во внимание, что значительное количество исследований было проведено в европейской территории России, где данное заболевание, по мнению многих авторов, протекает преимущественно в легкой и среднетяжелой формах [12]. Кроме этого при ГЛПС, несмотря на нормализацию лабораторных показателей и купирование клинических симптомов в периоде реконвалесценции, у ряда больных уровень циркулирующих иммунных комплексов остается повышенным [1, 11]. Предстояло выяснить, способствует ли это формированию хронической патологии почек у переболевших в результате длительной циркуляции ЦИК с остаточной инфекционностью, или специфические антитела комплексов связаны в данном случае с различными сывороточными протеинами.

Цель настоящей работы состояла в определении циркулирующих иммунных комплексов различных размеров в зависимости от формы и периода ГЛПС, а также оценки их специфичности с учетом новых

Таблица 1

Частота выявления циркулирующих иммунных комплексов у больных ГЛПС в зависимости от тяжести и периода болезни

Течение заболевания	Частота выявления циркулирующих иммунных комплексов в различные периоды ГЛПС, %				
	лихорадочный	олигурический	полиурический	реконвалесценции	всего
Тяжелое (n=167)	25,0±8,2	79,3±5,3	68,9±8,5	63,2±6,5	64,7±3,7
Средней тяжести (n=232)	56,7±8,11	75,2±4,5	74,5±5,8	64,7±6,6	69,8±3,0
Легкое (n=70)	50,0±11,71	56,5±10,3	64,2±12,8	73,3±11,4	60,0±5,8

<sup>1</sup> Разница статистически значима по отношению к тяжелой форме заболевания.

методических подходов. Было исследовано 469 образцов сыворотки крови, полученных в динамике от 247 больных ГЛПС в остром периоде заболевания и от 22 переболевших в возрасте от 16 до 71 года. Диагноз во всех случаях был установлен на основании клинико-эпидемиологических и лабораторных данных и подтвержден серологически в реакции непрямой иммунофлюоресценции. В 12,8% случаев заболевание протекало в легкой, в 54,5% случаев — в среднетяжелой и в 32,7% случаев — в тяжелой форме. В течении болезни выделялись следующие периоды: лихорадочный (1—7 день), олигурический (8—14 день), полиурический (15—21 день) и реконвалесценции (с 22 дня от начала болезни) [5].

Циркулирующие иммунные комплексы в сыворотке крови определяли по методу, основанному на селективной преципитации комплексов антиген-антитело в 3,75% полиэтиленгликоле с последующим спектрофотометрическим определением плотности преципитата [3]. Результаты выражали в единицах оптической плотности (ЕОП). В контрольной группе (60 здоровых доноров) цифры теста с полиэтиленгликолем составили  $132 \pm 52$  ЕОП (колебания от 20 до 200). Показатели более 200 ЕОП указывали на наличие циркулирующих иммунных комплексов, а до 200 ЕОП — на их отсутствие. Способ определения размеров комплексов заключался в использовании растворов полиэтиленгликоля-6000 разной концентрации (3 и 4%) для преципитации белков различной молекулярной массы [10].

Определение специфической РНК проводили следующим образом: иммунные комплексы выделяли из сыворотки крови по методу П.В. Стручкова и др. [10], осаждая их полиэтиленгликолем с молекулярной массой 6000 в течение 12 часов, с последующей 3-кратной отмывкой. После удаления супернатанта в осадке выделяли суммарную РНК стандартным гуанидинизотиоцианат-фенольным методом, используя наборы реагентов «ВекторРНК-экстракция» производства ЗАО «Вектор-Бест» по инструкции производителя.

Синтез кДНК и амплификацию участка S-сегмента, группоспецифичного к хантавирусам Хантаан/Сеул/Амур, проводили методом полимеразной цепной реакции с использованием праймеров и условий тест-системы «Вектор-Ханта-РНК-ампли-100». При статистической обработке использовали стан-

дартные методы расчета средних величин, а также их ошибок.

Результаты исследования показали, что циркулирующие иммунные комплексы образуются в сыворотке крови уже в первые дни появления клинических признаков вирусной инфекции. В целом частота их обнаружения не зависела от клинического варианта болезни, однако просматривалась зависимость уровня циркулирующих иммунных комплексов от тяжести инфекции в ранние сроки. Отмечено, что при тяжелой клинической форме ГЛПС на фоне лихорадки, в период появления ведущих синдромов болезни, циркулирующие иммунные комплексы присутствовали только в 1/4 случаев. В олигурическом периоде число больных с наличием циркулирующих иммунных комплексов увеличилось до 79,3% и оставалось высоким до периода реконвалесценции. При среднетяжелой и легкой формах в лихорадочный период эти комплексы обнаруживались в 2 раза чаще. В остальные периоды отмечалась та же закономерность, что и при тяжелой форме ГЛПС. При летальных исходах (9 образцов сыворотки) циркулирующие иммунные комплексы не были обнаружены, а показатели оптической плотности оказались на очень низких значениях (в пределах 17—34 ЕОП в сроки от 2 до 13 дня болезни). Нормализация лабораторных показателей и купирование клинических симптомов в периоде ранней реконвалесценции не сопровождалась восстановлением содержания иммунных комплексов, уровень которых оставался повышенным в среднем у 65% больных (табл. 1).

Известно, что образование циркулирующих иммунных комплексов является естественной иммунологической реакцией любого организма в ответ на чужеродный агент, поэтому важно иметь данные об их свойствах [7, 10]. Литературные источники трактуют патогенетическую значимость размеров циркулирующих иммунных комплексов неоднозначно. По мнению ряда авторов [2, 7, 10], патогенные свойства наиболее выражены у комплексов малых размеров, которые в отличие от более крупных не способны зафиксировать комплемент, поэтому не могут быть элиминированы фагоцитами и длительное время циркулируют в организме, оседая в тканях и вызывая реакции повреждения. По мнению других исследователей, как фактор, способствующий отложению

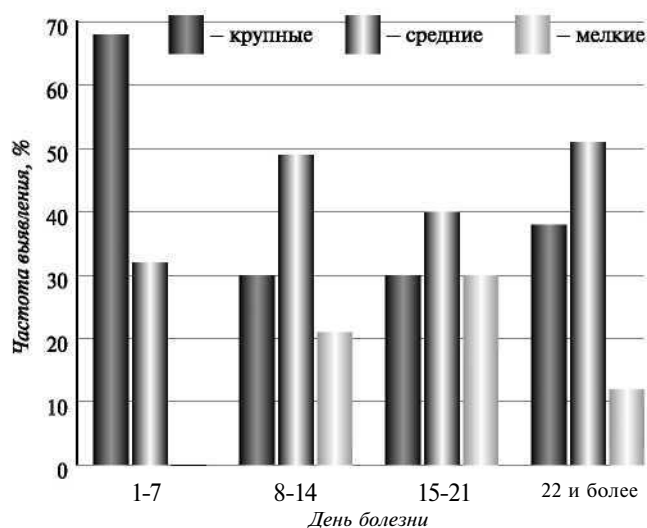


Рис. 1. Соотношение размеров циркулирующих иммунных комплексов в разные периоды ГЛПС.

циркулирующих иммунных комплексов в тканях при вирусных инфекциях, следует рассматривать их укрупнение в результате агрегации отдельных, содержащих антитела и антигены структур [8]. В.А. Иванис [5] и ряд других авторов также склонны считать циркулирующие иммунные комплексы крупных размеров маркерами возможных сосудистых повреждений — ишемии и некрозов тканей, ведущих к полиорганной недостаточности.

Определение степени дисперсности циркулирующих иммунных комплексов в наших исследованиях показало, что в ранние сроки болезни преобладали крупные (67,6%) и средние (32,3%) комплексы. Однако в течение инфекции происходило двукратное снижение числа лиц с иммунными комплексами крупных размеров и нарастание количества случаев со средними (до 50,8%) и мелкими циркулирующими иммунными комплексами (до 20%) к периоду ранней реконвалесценции (рис. 1). Поскольку размеры любого, даже самого мелкого вируса намного превосходят размеры молекулы иммуноглобулина [8], преобладание крупных циркулирующих иммунных комплексов в лихорадочный период объясняется их образованием в условиях избытка антигена. Но высокий уровень антителообразования, характерный для ГЛПС любой тяжести, приводит к быстрому (уже на 2-й неделе) появлению комплексов других размеров.

Таким образом, этот этап нашей работы показал, что на ранней стадии болезни циркулирующие иммунные комплексы могут быть важным патогенетическим фактором, снижающим частоту формирования тяжелых форм и возникновения urgentных состояний при ГЛПС. Отсутствие циркулирующих иммунных комплексов у большинства больных с тяжелой формой ГЛПС в период появления ведущих синдромов, определяющих тяжесть инфекции, и у умерших дает нам право предположить возможность прямого вирусного поражения чувствительных кле-

ток [13, 14], т.к. в эти сроки при регистрирующихся специфических антителах уже должно происходить массивное поступление иммунных комплексов в кровотоки из мест репродукции вируса.

Динамика титров антител в крови обследованных имела восходящий характер. По нашим данным, специфические антитела регистрировались с 4–6-го дня заболевания, достигая максимальных значений к 3-й неделе, и далее эти показатели выходили на плато. В этих же группах больных уровень циркулирующих иммунных комплексов соответствовал уровню антителообразования в каждом периоде болезни. Анализируя причины этого явления, логично было предположить участие специфических антител в образовании циркулирующих иммунных комплексов.

Поэтому следующим разделом данной работы явилось изучение динамики уровня специфического антигена хантавируса в составе иммунных комплексов и в крови. До настоящего времени специфический антиген в циркулирующих иммунных комплексах у больных ГЛПС был определен И.Н. Гавриловской [2] с помощью прямого иммуноферментного анализа в условиях избытка антигена. Нами в этом случае была использована более чувствительная полимеразно-цепная реакция, позволяющая исследовать широкий спектр иммунных комплексов, независимо от их физико-химических свойств.

Содержание хантавирусного антигена в крови 51 обследованного изменялось в течение заболевания и достоверно снижалось к периоду ранней реконвалесценции. Тяжелое и среднетяжелое течение инфекции характеризовалось одинаковой частотой обнаружения хантавирусной РНК в начальный период болезни (62,5%), уровень которой снижался к периоду ранней реконвалесценции до 13,3%. Параллельно с этим отмечалось существенное повышение частоты обнаружения специфического антигена в составе циркулирующих иммунных комплексов. РНК хантавируса в составе иммунных комплексов до 10 дня была обнаружена в 6 из 18 образцов сывороток, а в следующих образцах, взятых с 11 по 21 день, — в 16 из 28, т.е. чаще, чем в начальный период болезни. Это свидетельствовало, по всей видимости, о том, что за счет образования циркулирующих иммунных комплексов происходит элиминация специфических антигенов.

Нам представлялось важным выяснить прогностическое значение персистенции циркулирующих иммунных комплексов в отдаленном периоде, когда биохимические показатели крови не имели отклонений от нормы. Поздние реконвалесценты ГЛПС были обследованы в период от 1,5 месяца до 2 лет от начала заболевания. При исследовании сывороток крови лиц этой группы (22 человека) неспецифические циркулирующие иммунные комплексы были выявлены в 6 случаях, однако в составе комплексов ни у кого не была обнаружена геномная РНК хантавируса.

Известно, что избыточное количество циркулирующих иммунных комплексов способно, оседая в тканях, стать причиной ряда патологических процессов, реализуемых через активацию комплемента и цитокинов [5]. Также известно, что увеличение активности фактора некроза опухоли- $\alpha$  способствует экспрессии рецепторов адгезии и Fc- $\gamma$ -рецепторов на эндотелиоцитах [4, 5], что должно приводить к осаждению циркулирующих иммунных комплексов на эндотелиоцитах, повреждению клеток и запуску коагуляционных реакций. Однако было показано, что фактор некроза опухоли- $\alpha$  дает дозозависимый эффект в отношении ряда биологических факторов, в частности влияя на процесс элиминации циркулирующих иммунных комплексов [13]. Так, его активность в пределах  $240 \pm 73$  ЛЕ/мл способствует элиминации комплексов, тогда как низкая активность (3,5 ЛЕ/мл) не дает такого эффекта. По данным В.А. Иванис [5], в общей группе больных ГЛПС в Приморском крае уровень этого цитокина в ранние сроки болезни (1—2-я недели) в 5—10 раз превышал контрольный. Характерно, что в поздние сроки инфекции (3—4-я недели) сохранялись высокие уровни только фактора некроза опухоли- $\alpha$  при нормализации концентраций других провоспалительных цитокинов. Можно предположить, что гиперпродукция эндотелиоцитами указанного цитокина (особенно в поздние сроки) приводит не к повышению, а к значительному уменьшению экспрессии рецепторов адгезии и Fc- $\gamma$ -рецепторов, что препятствует, в свою очередь, осаждению иммунных комплексов в интима сосудов и запуску коагуляционного каскада.

Быстрота элиминации циркулирующих иммунных комплексов зависит от многих причин, в том числе большую роль в их накоплении и персистенции в организме, создающих опасность возникновения иммунокомплексных поражений, играет функциональное состояние фагоцитирующей системы. Как показали Т.А. Малинина и др. [6], а также В.Г. Морозов [7], при ГЛПС функциональное состояние нейтрофилов не страдает и в большинстве случаев наблюдается даже усиление их фагоцитарной активности.

Нами получены данные о том, что индукция циркулирующих иммунных комплексов при геморрагической лихорадке с почечным синдромом носит скорее защитный, чем повреждающий характер, и направлена в основном на элиминацию инфекционного агента. Это согласуется с данными Б.З. Сиротина [9], который представил доказательства, отрицающие роль иммунокомплексных механизмов в формировании органной патологии при геморрагической лихорадке с почечным синдромом. Автор считал циркулирующие иммунные комплексы нейтрализующими, способствующими элиминации возбудителя. Формирование основных клинико-патогенетических синдромов связано с непосредственным действием вируса на клетки-мишени и иммунокомпетентные клетки, большой инфициру-

ющей дозой возбудителя, что подтверждалось выделением вирусной РНК в крови до 18 дня болезни и циркуляторными расстройствами, обусловленными дисбалансом цитокинового статуса.

#### Литература

1. Владимирова Т.П. // Автореф. дис. ... докт. биол. наук. — Хабаровск, 1997.
2. Гавриловская И.Н., Подгородниченко В.К., Апекина Н.С. и др. // Микробиол. журн. — 1987. — Т. 49, №4. — С. 71-76.
3. Гриневиц Ю.А., Алферов А.Н. // Лабораторное дело. — 1981. — №8. — С. 493-495.
4. Дадаева А.А., Сизикова Л.П., Чепурнов А.А. // *Вопр. вирусологии.* — 2004. — № 2. — С. 11-18.
5. Иванис В.А. // Автореф. дис. ... докт. мед. наук. — Владивосток, 2004.
6. Малинина Т.А., Рябов В.И., Малинин О.В. // *Журн. микробиол.* — 1994. — №1. — С. 100-103.
7. Морозов В.Г. // Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — СПб., 1993.
8. Первигов Ю.В., Эльберт Л.Б. *Иммунные комплексы при вирусных инфекциях.* — М., 1984.
9. Сиротин Б.З. *Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом.* — Хабаровск, 1994.
10. Стручков П.В., Константинова Н.А., Лаврентьев В.В. и др. // *Лаб. дело.* — 1985. — № 7. — С. 410-412.
11. Суздальцев А.А. // Автореф. дис. ... докт. мед. наук. — СПб., 1992.
12. Ткаченко Е.А., Деконенко А.Е., Дзагурова Т.К. // *Хантавирусы и хантавирусные инфекции.* — Владивосток, 2003. — С. 56-78.
13. Alves-Rosa M.F., Palermo M.S., Isturiz M.A. // *Clin. Immunol. Immunopathol.* — 1998. — Vol. 89, No. 3. — P. 214-221.
14. Shen K., Li L., Zhou H. // *Abstr. of 2nd Intern. Conf. «Hemorrhagic fever with renal syndrome».* — Beijing, China, 1992. — P. 41.

Поступила в редакцию 19.06.06.

#### ESTIMATION OF VALUE OF CIRCULATING IMMUNE COMPLEXES IN THE PATHOGENESIS OF THE HEMORRHAGIC FEVER WITH RENAL SYNDROME

I.G. Maksyoma, T.V. Kushnareva, R.A. Slonova, V.A. Ivanis  
Scientific research institute of epidemiology and microbiology  
Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Science  
(Vladivostok), Vladivostok State Medical University

*Summary* — The results of studying of dynamics of circulating immune complexes at patients with hemorrhagic fever with renal syndrome are shown. The activity of process of formation of complexes depends on a clinical variant of illness only in early terms and reaches the maximal values by the 3rd week of disease. It is found, that in the feverish period of illness the circulating immune complexes of big size prevail. The dynamics of circulation of an antigen of a virus in blood is investigated as well as in structure of immune complexes. It is shown, that along with decrease in the maintenance of hantavirus antigen in blood by the period of early recovery there is an essential increase of frequency of detection of specific antigen in structure of circulating immune complexes.