

УДК 616.995.122:616-07

Ключевые слова: описторхоз, иммунный ответ, лечение

Статья.Россия, 13 мая 02 г.

Н.В.Карбышева, Л.В. Султанов, С.И Белых, К. Мак Косланд, Э. Оганова

### **Алтайский центр по профилактике и борьбе со СПИДом; «4 – Life Research L.C.», США**

Литературные данные, освещающие состояние гуморального и клеточного звеньев иммунной системы при описторхозной инвазии, чрезвычайно противоречивы (1, 3, 5, 12). Размах колебаний значений иммунологических показателей - от достоверно значимых превышений нормативных уровней до достоверного их снижения при идентичных проявлениях процесса или проводимого лечения (10, 11). Наиболее согласуются данные о значительной уязвимости при описторхозе Т-системы лимфоцитов, что проявляется изменением количественных характеристик этой популяции и её субпопуляций (5, 12). Этот процесс трактуется с позиции Т- супрессии, подавления ответа Т – лимфоцитов на специфические антигены, обусловленной, по мнению авторов (5, 10), воздействием «фактора» гельминта, что не объясняет всех особенностей формирования иммунного ответа при описторхозе. В последние годы стали появляться работы, поднимающие вопросы патогенеза данной инвазии с позиции генетической толерантности к антигенам описторхисов (7) и феномена персистенции «функциональных» антигенов паразитов (4). Проведенные нами ранее исследования по изучению гуморального звена иммунной системы у больных описторхозом (2) позволили рассматривать выявленную активацию иммунного ответа при хроническом описторхозе как отражение взаимодействия с антигеном, характеризующимся слабовыраженной иммуногенностью. Гуморальные компоненты при данной инвазии являются скорее её специфическими маркерами, но не обладают защитными свойствами, что приводит к персистенции описторхисов и взаимной адаптации паразита и хозяина на длительный срок. Установлено, что развитие специфического защитного иммунного ответа, даже при длительной персистенции этиологического фактора, можно обеспечить путем активации первой стадии иммунного ответа с максимальной индукцией цитокинов первой фазы (8, 13). Подтверждение гипотезы об *Op.felineus* как слабоиммуногенном антигене может быть получено при использовании иммуномодуляторов (9, 14), стимулирующий эффект которых выражается в активации моноцитарно-макрофагального звена иммунной системы (индуцибельная фаза иммунного ответа). В этом отношении интерес представил препарат Transfer Factor Plus производства фирмы «4 – Life Research L.C.», США, в своей основе представляющий сигнальные молекулы, которые «обучают» и «тренируют» незрелые иммунные клетки для полноценного распознавания многих микроорганизмов (15).

Целью исследования явилась сравнительная оценка динамики показателей иммунной системы у больных хроническим описторхозом при лечении бильтрицидом и с использованием Transfer Factor Plus.

#### **Материалы и методы.**

Обследовано 94 пациента в возрасте от 20 до 60 лет. У 24 (25,5%) больных инвазия протекала латентно, у 70 (74,5%) – клинически выражено. Преобладали

гепатохолангитический (40,9%), астеновегетативный (33,3%) варианты течения хронической фазы описторхоза. У 30% больных на коже периодически появлялись высыпания, у 12% возникали приступы удушья по типу бронхиальной астмы, артралгический синдром развился у 25(27%) больных, явления васкулита - у 17 (18%). В 95% случаев описторхоз был выявлен впервые, у остальных пациентов в анамнезе курс дегельминтизации бильтрицидом, без эффекта. Диагноз хронического описторхоза верифицировали данными микроскопии желчи (дуоденальное зондирование) или содержимого кишечника (наличие яиц *Op.felineus* или взрослых паразитов).

У всех наблюдаемых больных изучено состояние гуморального звена иммунной системы – в сыворотке крови проведено определение уровня иммуноглобулинов трех основных классов М, G, А, содержания циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК). У 45 больных хроническим описторхозом определена концентрация провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ).

Всем больным проведена антигельминтная терапия бильтрицидом (фирма «Байер») по рекомендуемой схеме: 75 мг на кг/массы в три приема, перорально, курс лечения – 1 день. 50 больным этой группы (1-я группа, опыт) после приема антигельминтика проведен 7-ми дневный курс лечения Transfer Factor Plus. Препарат назначался по 2 капсулы 3 раза в сутки. Остальные 44 пациента, получавшие только бильтрицид, составили контрольную группу (2-я группа), сопоставимую по полу, возрасту, клиническим проявлениям обследуемых больных.

Все исследуемые показатели в 2 – х группах больных определяли до начала терапии и через 2 недели, 3 месяца после ее проведения. Диспансерное наблюдение осуществлялось на протяжении полугода.

Для оценки полученных данных обследовано 75 доноров в возрасте от 18 до 50 лет.

Определение ЦИК проведено методом преципитации 4% ПЭГ-6000. Величину оптической плотности определяли против контроля при длине волны 450 нм на вертикальном спектрофотометре Multiskan MCC/340. Количество ЦИК выражали в условных единицах (у.е.).

Определение концентрации цитокинов в сыворотке крови выполнено на тест-системах ProCon IL-1 $\beta$ , ProCon TNF- $\alpha$ , ProCon IFN- $\gamma$  производства ООО "Протеиновый контур" г.С.-Петербург по инструкции производителя. Результаты иммуноферментного анализа регистрировали на вертикальном фотометре Multiskan MCC 340 в при длине волны 492 нм. Для определения концентрации интерлейкинов в анализируемых образцах строился калибровочный график по средней оптической плотности каждого стандартного раствора.

Содержание иммуноглобулинов определялось прямым сандвич вариантом иммуно-ферментного анализа. В работе применяли коммерческий конъюгат пероксидазы с антителами к иммуноглобулинам человека (Московский НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи), моноспецифические антисыворотки к иммуноглобулинам человека А, М, G, стандартную сыворотку крови человека производства этого же института или Горьковского НИИЭМ. В качестве твердой фазы использовали 96-луночные планшеты для иммунологических реакций. Детекцию проводили на вертикальном фотометре Multiskan MCC 340 в двух волновом режиме 492/600 нм.. Вычисления проводили с помощью персонального компьютера и прикладной программы, разработанной на базе SK4 для сандвич-варианта ИФА. Так же исследования выполнялись на тест-системах

IgM, IgA, IgG-стрип производства ЗАО "Вектор-БЕСТ" по инструкции производителя. Результаты иммуноферментного анализа регистрировали на вертикальном фотометре Multiskan MCC 340 в при длине волны 492 нм.

Статистическая обработка вариационных рядов включала подсчет средних арифметических величин ( $\bar{X}$ ) и стандартных ошибок средних арифметических ( $m$ ), стандартного отклонения. В работе использовались методы непараметрической статистики. Значимость различий вариационных рядов в связанных попарно выборках оценивалась с помощью U - критерия Вилконсона - Манна - Уитни, критерия  $\chi^2$ , корреляция показателей вычислялась по методу Спирмена. Анализ данных проводился с помощью пакета прикладных программ Statgraf.

Результаты и их обсуждение.

У пациентов 1-ой группы в процессе клинических наблюдений после назначения антигельминтика и приема Transfer Factor Plus при сравнении с контрольной группой не зарегистрировано развития астеновегетативного синдрома, появления и/или усиления болей в правом подреберье, часто возникающих после приема бильтрицида (у 73% и 52% больных 2-ой группы соответственно). В 1-ой группе обследуемых через 4 месяца после лечения у всех больных с артралгическим синдромом (12 человек) и у 7 из 9 больных с васкулитами наступило полное выздоровление. Во 2-ой группе, получавших только бильтрицид, остаточные явления в виде артралгий, васкулитов продолжали беспокоить соответственно в 95% и 100% случаев (по  $\chi^2$   $p < 0,001$ ) весь регламентируемый при описторхозе период диспансерного наблюдения (в течение полугода).

Результаты исследования состояния гуморального звена иммунной системы у пациентов с хронической фазой описторхоза до лечения показали, что практически в 100% случаев у обследованных больных обнаруживаются те или иные изменения.

В сыворотке крови было увеличено содержание всех трех классов иммуноглобулинов (табл.1). Более чем в 2 раза при оценке «средних» значений уровень иммуноглобулина класса М превышал показатели «средней» контрольной группы ( $p < 0,001$ ). Установлено достоверное повышение уровня IgG. Наибольшей выраженности у наблюдаемых больных достигала продукция IgA ( $p < 0,001$ ).

Хроническая фаза описторхоза характеризовалась и достоверно повышенным образованием ЦИК. При проведении корреляционного анализа была установлена обратная взаимосвязь между уровнем ЦИК и концентрацией IgA (-0,64,  $p < 0,001$ ) при меньшей зависимости образования ЦИК от содержания IgM (-0,26) и IgG (-0,32).

Превышение границы значений контрольной группы отмечено как у больных с манифестным течением описторхоза, так и у 60 % больных с латентным течением инвазии.

У 45 больных хроническим описторхозом до проведения антигельминтной терапии определяли уровни концентраций IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  (табл. 2).

Результаты исследования содержания основного провоспалительного интерлейкина IL-1 $\beta$  показали достоверное увеличение ее уровня, более чем в пять раз превышающее значения «средней» группы доноров ( $p < 0,001$ ). Анализ индивидуальных значений полученных данных показал увеличение концентрации IL-1 $\beta$  у всех обследуемых.

Концентрация TNF- $\alpha$  была также повышена, но достоверных различий при сравнении со «средней» в группе доноров установить не удалось.

В то же время исследование уровня концентрации IFN- $\gamma$  у больных хроническим описторхозом не выявило достоверных различий с показателями в группе доноров ( $p > 0,05$ ).

Использование традиционной только антигельминтной терапии бильтрицидом не сопровождалось существенными изменениями изучаемых показателей состояния гуморального звена иммунной системы, отражая определенную монотонность процесса.

На протяжении всего периода наблюдений практически без изменений при сопоставлении с показателями до лечения оставались уровни IgG и ЦИК.

Через 2 недели после лечения бильтрицидом несколько выше стал уровень IgM, что можно рассматривать как результат действия антигельминтика, «обнажающего» высокоиммуногенные структуры паразита (3, 6, 8). Отмечено некоторое повышение уровня IgA.

В группе больных, получавших наряду с антигельминтиком Transfer Factor Plus, выявлена иная динамика изучаемых показателей.

Уже через 2 недели после лечения отмечено нарастание уровня IgG и более активное образование ЦИК. Максимальных значений уровень ЦИК в этой группе достигал через 3 месяца после лечения, в 2,5 раза превышая показатели во 2 группе.

Концентрации провоспалительных IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$  существенно не изменились (табл. 2), оставаясь повышенными при сравнении с донорами ( $p < 0,05$ ), достоверно не отличаясь от значений контрольной группы. Значительно возросло при применении Transfer Factor Plus содержание IFN- $\gamma$ , более чем в 2 раза с показателями до лечения и в контрольной группе.

Таким образом, выявленная в целом активация гуморального звена иммунной системы при хронической фазе описторхоза до лечения отражает особенности ответа при взаимодействии с антигеном, характеризующимся слабовыраженной иммуногенностью. Гуморальные компоненты иммунного ответа при описторхозной инвазии являются лишь её специфическими маркерами, но не обладают защитными свойствами, что и обеспечивает длительное выживание *Op.felineus* в организме хозяина.

Существующий дисбаланс содержания исследованных цитокинов можно рассматривать как еще одно свидетельство неполноценности иммунного ответа при хронической фазе описторхоза с отсутствием главной компоненты - защитного эффекта. Мы видим повышение концентрации IL-1 $\beta$ , способного индуцировать большую часть местных и общих проявлений воспалительной реакции, запускающего начальные события иммунного ответа, в частности к вовлечению в него Т-хелперов (9). Способность *Op.felineus* к «экранированию» как поверхностных структур паразита, так и высокоиммуногенных антигенов (3), по-видимому, объясняет тот факт, что лишь у небольшой части обследованных повышен уровень TNF- $\alpha$ , продукция которого включается в том числе и при условии распознавания липопротеидов экзогенов. Как отражение индукции слабо специфического иммунного ответа и отсутствие сдвигов уровня IFN- $\gamma$ , роль которого в активации антигенпредставляющих клеток – макрофагов и последующей стимуляции экспрессии молекул АГ ГКГ 2 класса, необходимых для развития специфического иммунного ответа чрезвычайно важна (16, 17).

Положительная динамика иммунного ответа была получена при использовании в терапии больных хроническим описторхозом Transfer Factor Plus. Результаты проведенного исследования свидетельствуют о несомненной клинико-иммунологической эффективности данного продукта.

*Применение Transfer Factor Plus способствует активации моноцитарно-макрофагального звена, что определяется увеличением концентрации IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$  и особенно IFN- $\gamma$ , приводящей к индукции второй фазы иммунного ответа, с последующим формированием специфического защитного иммунитета.*

Назначение Transfer Factor Plus считаем целесообразным в комплексном лечении больных данной инвазией. Иммунореабилитация с использованием Transfer Factor Plus, проводимая вслед за дегельминтизацией бильтрицидом способствует скорейшей элиминации антигенов описторхий (динамичное образование ЦИК), предупреждая тем самым развитие иммунопатологических процессов и обеспечивает более полное и раннее выздоровление.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Белозеров Е.С. Описторхоз / Шувалова Е.П. – Л.: Медицина, 1981. – 128 с.
2. Карбышева Н.В. Иммунный ответ у больных хроническим описторхозом / Трунов А.Н., Киушкина И.Н., Обухова О.О./ Консилиум. -2001. -№ 6. С. 15-18.
3. Котелкин А.Т. Поиски изучения иммунологических маркеров *Opisthorchis felinus* и исследование возможности их использования для иммунодиагностики описторхоза: Автореф. дис. ... канд. биологических наук. --Кольцово, 2000. – 20 с.
4. Кузнецова В.Г. О патогенезе хронических и резидуальных форм описторхоза // Мед. паразитология и паразитарные болезни. – 2001 -№ 2. – С. 21-23.
5. Лепехин А.В. Эпидемиология, клиника и профилактика описторхоза / Мефодьев В.В., Филатов В.Г., Бужак Н.С. – Томск, 1992. – 230 с.
6. Налобин В.А. Закономерности восстановительного процесса после химиотерапии описторхоза // Описторхоз. Современное состояние проблемы, перспективы развития: Сб. тез. Юбилейной конф. – Тюмень, 1991. – С. 163-165.
7. Озерецковская Н.Н. Толерантность к антигенам описторхисов: иммунитет или генетика /Шуйкина Э.Е., Парфенов С.Б. // Описторхоз. Современное состояние проблемы, перспективы развития: Сб. тез. Юбилейной конф. – Тюмень, 1991. – С. 171 – 174.
8. Петров Р.В., Хайтов Р.М., Пинегин Б.В. Оценка иммунного статуса человека в норме и при патологии // Иммунология.- 1994.- №6.- С.6-9.
9. Пинегин Б.В., Андропова Т.М., Юдина Т.И. Иммунодиагностика и иммунотерапия хирургических инфекций // International J. on Immunorehabilitation. - 1998. - N10. - P.86-100.
10. Савин В.А. Сравнительный анализ влияния бильтрицида и хлоксила на иммунный статус больных описторхозом /Моисеенко А.В., Далматов Д.М., Черемных Л.Г. // Описторхоз. Современное состояние проблемы, перспективы развития: Сб. тез. Юбилейной конф. – Тюмень, 1991. – С. 222 – 224.

11. Сергиев В.П. Паразитарные болезни человека, их профилактика и лечение / Лебедева М.Н., Фролова А.А., Романенко Н.А.// Эпидемиология и инф. болезни. –1997. - № 2. – С. 8 - 10.
12. Степанова Т.Ф. Клиническая реабилитация в комплексе мер борьбы с описторхозом /Скарედнов Н.И. // Описторхоз. Современное состояние проблемы, перспективы развития: Сб. тез. Юбилейной конф. – Тюмень, 1991. – С. 232 – 234
13. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Современные представления о защите организма от инфекций // Иммунология. - 2000. - N1. - С.61-64.
14. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Основные принципы иммуномодулирующей терапии // Аллергия, астма и клиническая иммунология. - 2000. - N1. - С.9-16.
15. Хэннен Д. Трансфер Фактор – Плюс /Под ред. Ю.П.Гичева и Э.Огановой. – Новосибирск, 2001. – 73 с.
16. Paul W.E., Seder R.A. Lymphocyte responses and cytokines // Cell. - 1998. - V.76. - P.241.
17. Roirr I., Brostoff J., Male D. Immunology. - Fourth Edition. - 1998. - 281 p.

**Таблица 1**

**Динамика иммунных показателей у больных хроническим описторхозом в зависимости от вида лечения ( $\bar{X} \pm m$ )**

Показатель	Доноры (n = 75)	Больные описторхозом						После лечения	
		1-я группа (n =50)		2 –я группа (n = 44)					
		До лечения	После лечения		До	После лечения		ч/з 2	ч/з 3
		ч/з 2 недели	ч/з 3 месяца	лечения	ч/з 2 недели	ч/з 3 месяца	недели	месяца	
Ig M, г/л	1,04 ± 0,02	1,78 ± 0,09 p < 0,001 p <sup>1</sup> > 0,05	2,09±0,11 p < 0,001 p <sup>1</sup> > 0,05	1,3±0,14 p < 0,05 p <sup>1</sup> < 0,001	1,80±0,08 p < 0,001	2,01±0,11 p < 0,001 p <sup>1</sup> > 0,05 p <sup>2</sup> > 0,05	2,01±0,24 p < 0,001 p <sup>1</sup> > 0,05 p <sup>2</sup> < 0,001	2,01±0,11 p < 0,001 p <sup>1</sup> > 0,05 p <sup>2</sup> > 0,05	2,01±0,24 p < 0,001 p <sup>1</sup> > 0,05 p <sup>2</sup> < 0,001
Ig A, г/л	1,08±0,02	2,60 ± 0,20 p < 0,001	2,60±0,30 p < 0,001 p <sup>1</sup> > 0,05	1,08±0,09 p > 0,05 p <sup>1</sup> < 0,001	2,90±0,20 p < 0,001	3,10±0,31 p < 0,001 p <sup>1</sup> > 0,05 p <sup>2</sup> > 0,05	2,60±0,40 p < 0,001 p <sup>1</sup> > 0,05 p <sup>2</sup> < 0,001	3,10±0,31 p < 0,001 p <sup>1</sup> > 0,05 p <sup>2</sup> > 0,05	2,60±0,40 p < 0,001 p <sup>1</sup> > 0,05 p <sup>2</sup> < 0,001
Ig G, г/л	10,00±0,27	12,90±0,50 p < 0,001	13,90±0,60 p < 0,001 p <sup>1</sup> > 0,05	14,40±0,90 p < 0,001 p <sup>1</sup> > 0,05	12,60±0,30 p < 0,001	12,80±0,80 p < 0,001 p <sup>1</sup> > 0,05 p <sup>2</sup> > 0,05	9,80±0,60 p < 0,001 p <sup>1</sup> < 0,001 p <sup>2</sup> < 0,001	12,80±0,80 p < 0,001 p <sup>1</sup> > 0,05 p <sup>2</sup> > 0,05	9,80±0,60 p < 0,001 p <sup>1</sup> < 0,001 p <sup>2</sup> < 0,001
ЦИК (у.е.оп.)	61,0 ± 2,6	106,1±5,9 p < 0,05	138,7±8,8 p < 0,001 p <sup>1</sup> < 0,001	250,3±9,1 p < 0,001 p <sup>1</sup> < 0,001	105,7±6,1 p < 0,05	104,5±6,3 p < 0,05 p <sup>1</sup> > 0,05 p <sup>2</sup> < 0,001	105,6±8,6 p < 0,05 p <sup>1</sup> > 0,05 p <sup>2</sup> < 0,001	104,5±6,3 p < 0,05 p <sup>1</sup> > 0,05 p <sup>2</sup> < 0,001	105,6±8,6 p < 0,05 p <sup>1</sup> > 0,05 p <sup>2</sup> < 0,001

**Примечание:** 1-я группа, лечение с применением *Transfer Factor Plus*;  
2 –я группа, лечение бильтрицидом;  
p - достоверные различия с донорами;  
p<sup>1</sup> - достоверные различия до и после лечения;  
p<sup>2</sup> - достоверные различия после лечения между группами.

Таблица 2

**Изменение концентрации цитокинов у больных хроническим описторхозом  
в зависимости от вида лечения ( $X \pm m$ )**

Показатель (пкг/мл)	Доноры (n = 15)	Больные описторхозом			
		1-я группа (n = 25)		2-я группа (n = 20)	
		До лечения	ч/з 2 недели после лечения	До лечения	ч/з 2 недели после лечения
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	39,4 $\pm$ 4,9	212,3 $\pm$ 9,8  p < 0,001	231,3 $\pm$ 11,8 p < 0,001  p <sup>1</sup> > 0,05	213,8 $\pm$ 12,8 p < 0,001	220,6 $\pm$ 13,0  p < 0,001  p <sup>1</sup> > 0,05  p <sup>2</sup> > 0,05
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	19,6 $\pm$ 2,4	68,2 $\pm$ 4,1  p < 0,001	74,2 $\pm$ 3,1  p < 0,001  p <sup>1</sup> > 0,05	68,2 $\pm$ 6,6  p < 0,001	72,3 $\pm$ 3,6  p < 0,001  p <sup>1</sup> > 0,05  p <sup>2</sup> > 0,05
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	46,2 $\pm$ 6,2	43,4 $\pm$ 3,1  p > 0,05	106,4 $\pm$ 6,1  p < 0,05  p <sup>1</sup> < 0,05	42,9 $\pm$ 6,6  p > 0,05	51,4 $\pm$ 6,3  p > 0,05  p <sup>1</sup> > 0,05  p <sup>2</sup> < 0,05

*Примечание: 1-я группа, лечение с применением Transfer Factor Plus;*

*2-я группа, лечение без применения Transfer Factor Plus;*

*p – достоверные различия с донорами;*

*p<sup>1</sup> - достоверные различия до и после лечения;*

*p<sup>2</sup> - достоверные различия после лечения между группами*