

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК: 616.36-002.2-022

©Коллектив авторов

СНИЖЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ГЕПАТИТА С ПРИ АНТИВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ

Л.И. Николаева^{1}, В.В. Макашова², Е.В. Петрова³, Г.А. Шипулин²,
Е.И. Самохвалов¹, А.К. Токмалаев⁴, Д.К. Львов¹*

¹ФГУН НИИ Вирусологии им. Д.И. Ивановского, РАМН, г. Москва; 123098, Москва, ул. Гамалеи, 16, ФГУН НИИ Вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН; тел. (499) 190-30-50; эл. почта: L.I.Nikolaeva@mail.ru

²ФГУН Центральный НИИ эпидемиологии, Роспотребнадзор, Москва

³Инфекционная клиническая больница №2, Департамент здравоохранения г. Москвы

⁴Российский университет дружбы народов, г. Москва.

Исследовано содержание антител к отдельным структурным и неструктурным белкам вируса гепатита С в течение 2-х лет в трех группах больных: с позитивным результатом на момент окончания лечения, с негативным результатом и в группе сравнения (без терапии). В группах, где проводилось лечение, наблюдалось снижение уровня антител ко всем анализируемым белкам ВГС, но интенсивность этого процесса была разной. Статистически достоверные самые ранние различия в снижении содержания специфических антител между пациентами с первичным позитивным и негативным результатом терапии были обнаружены в первые три месяца лечения. У некоторых больных снижение уровня антител к белкам ВГС продолжалось и после окончания терапии.

Ключевые слова: гепатит С, комбинированная терапия, антитела.

ВВЕДЕНИЕ. Вирусом гепатита С (ВГС) инфицировано около 3% населения нашей планеты, и эпидемиологический прогноз экспертов на ближайшее будущее не оптимистичен [1, 2]. Особенностью инфекции, вызываемой этим вирусом, является частое развитие ее хронической формы, которая может прогрессировать в цирроз печени или гепатоцеллюлярную карциному, а также приводить к внепеченочным проявлениям [3].

ВГС относится к семейству *Flaviviridae*, род *Hepacivirus* [4]. Геном вируса представлен плюс-цепью РНК, которая содержит одну открытую рамку считывания, ограниченную с 5'- и 3'-конца нетранслируемыми областями. Эта рамка кодирует белок-предшественник, из которого с участием клеточных и вирусных ферментов

* - адресат для переписки

образуются полипептиды ВГС: кор (core), оболочечные (Е1 и Е2), виropopин (p7), NS2-протеаза, сериновая протеаза-хеликаза (NS3), кофактор сериновой протеазы (NS4a), компоненты репликативного комплекса (NS4b и NS5a), РНК-зависимая РНК-полимераза (NS5b). Для ВГС характерно наличие вариабельных участков в геноме, что послужило причиной для выделения 6 генотипов и около 90 подтипов вируса [5].

Терапия интерфероном-альфа (ИФН-α) в комбинации с рибавирином является наиболее приемлемой для лечения гепатита С. Эффективность курса терапии оценивается по трем критериям: биохимическому – нормализация уровня аланин- и аспарагинаминотрансферазы (АлАТ и АсАТ, соответственно), вирусологическому – отсутствие РНК ВГС в крови, цитологическому – уменьшение патологических изменений в биоптате печени. Снижение содержания специфических антител в процессе терапии может быть дополнительным серологическим критерием эффективности лечения, которое иногда приходится оценивать по первым двум параметрам из-за отказа больных от пункционной биопсии печени. Кроме того, вирусологический критерий зависит от методов выявления РНК ВГС, предел чувствительности которых периодически совершенствуется.

Первые попытки установить корреляцию между исходом терапии и изменением уровня антител к ВГС были сделаны в 1990-х годах [6-14]. Но полученные данные были противоречивы в основном из-за неоптимальных и нестандартных конструкций иммуноферментных тест-систем. Особое внимание исследователи уделяли обнаружению серологических предикторных маркеров, предсказывающих большую вероятность позитивного результата лечения [6, 12-17]. По современным представлениям, наиболее вероятными кандидатами на роль таких предикторов являются антитела к вирусным антигенам NS4a, NS5a и к 1-му гипервариабельному региону (ГВР) белка Е2 [15, 16]. Однако до сих пор нет единого общепринятого мнения на этот счет. Очевидно, это связано с отсутствием в медицинской практике большинства государств стандартных иммуноферментных тест-систем, позволяющих определять антитела к отдельным белкам ВГС [16]. В этом отношении в нашей стране ситуация более благоприятная, потому что с конца 1990-х годов подобные диагностикумы выпускаются несколькими производителями.

Используя возможности отечественных коммерческих и лабораторных иммуноферментных тест-систем, мы провели мониторинг уровня антител к индивидуальным белкам ВГС в процессе терапии и после ее окончания и установили закономерности изменения содержания антител к отдельным вирусным белкам и к В-эпитопам 1-го ГВР белка Е2.

МЕТОДИКА. Исследованы образцы крови от 60 пациентов (45 мужчин и 15 женщин в возрасте 20-60 лет) с хроническим гепатитом С, без маркеров других вирусных острых и хронических гепатитов и ВИЧ-инфекции. Данное исследование было одобрено этическим комитетом Инфекционной клинической больницы №2 и выполнено с согласия пациентов.

Больные получали 24- и 48-недельный курс комбинированной терапии ИФН-α (3×10^6 IU трижды в неделю) и рибавирином в дозе 13 мг/кг. При назначении терапии и выборе длительности лечения были использованы стандартные критерии. Забор крови производили перед началом терапии (стартовая точка), в процессе (1, 3, 6, 9, 12 мес) и после окончания лечения (1, 3, 6, 12 мес). По завершению терапии случайным выбором были сформированы равные по численности группы больных (n=20) с первичным позитивным результатом (ППР) и негативным результатом (НР) терапии, а также группа сравнения, которую составили пациенты с легким течением хронического гепатита С без этиотропного лечения. Сведения об этих группах больных представлены в таблице 1. Через 6 месяцев после окончания терапии пациенты, не имеющие РНК ВГС в крови, были включены в группу (n=15) с устойчивым позитивным результатом (УПР), а больные, у которых появилась РНК, – в новую группу (n=25) с негативным результатом (НР*) лечения.

Таблица 1. Сравнительная характеристика групп больных.

Показатели	Группа с ППР	Группа с НР	Группа сравнения
Возраст (годы)	33,1±2,4	32,1±3,0	40,6±3,4
Пол: мужской женский	17 3	14 6	13 7
Активность АлАТ*	3,32±0,445	3,36±0,49	1,82±0,21
Активность АсАТ	1,91±0,28	1,93±0,19	1,23±0,20
Содержание РНК: >10 ⁶ (МЕ/мл) <10 ⁶ (МЕ/мл)	(4,75±2,13)×10 ⁶ 11 9	(7,01±3,07)×10 ⁷ 13 7	Не определено
Генотип вируса: 1a 1b 2a 3a	 6 14	 1 7 1 11	 1** 5 1 10

Примечание: * - Активности АлАТ и АсАТ даны как кратности превышения верхней границы нормы, которая составила 36 Е/л для женщин и 39 Е/л для мужчин. ** - В этой группе РНК ВГС обнаружена только у 17 человек.

РНК ВГС и генотип вируса выявляли с помощью ОТ-ПЦР (обратная транскрипция- полимеразная цепная реакция) в коммерческих тест-системах: АмплиСенс-100-R для обнаружения РНК и АмплиСенс-50-R для генотипирования (“ИнтерЛабСервис”, Россия). Вирусная нагрузка была определена с помощью коммерческого количественного теста Gene Amp PCR System 2400 (“Applied Biosystems”, США). Образцы, отрицательные по данным этого анализа, были исследованы в коммерческой тест-системе РеалБест РНК ВГС с чувствительностью 15 МЕ/мл (“Вектор-Бест”, Россия).

Иммуноглобулины G, специфичные к вирусным антигенам кор, NS3, NS4ab и NS5a, выявляли с помощью коммерческого иммуноферментного набора РекомбиБест анти-ВГС-спектр IgG (“Вектор-Бест”, Россия), сравнительная характеристика которого дана ранее [18]. Рекомбинантные полипептиды имели следующие размеры: кор – 1-123 аминокислотных остатка (а.о.), NS3 – 1260-1459 а.о., NS4ab – 1658-1812 а.о., NS5a – 2052-2302 а.о. Титры антител определяли 2-кратным разведением образцов с начального титра 1:4 до последнего значения, при котором оптическая плотность (ОП) образца была выше пороговой ОП, вычисленной по инструкции производителя. Коэффициент позитивности (КП) рассчитывали как отношение ОП исследуемой сыворотки к пороговой ОП. Изменение коэффициента позитивности (ΔКП) определяли вычитанием из КП последующей временной точки значения КП предыдущей точки. Анти-ВГС IgM (к смеси 4-х антигенов, описанных выше) выявляли с помощью коммерческого иммуноферментного набора РекомбиБест анти-ВГС IgM (“Вектор-Бест”, Россия).

Антитела к линейным В-эпитопам 1-го ГВР определяли с помощью трёх синтетических пептидов, структура которых соответствовала консенсусной последовательности этого региона [19]. Пептиды имели следующую последовательность а.о.: I – ETHVTGGSAARTTSG, II – GSAARTTSGLTSSLF, III – SGLTSLFSPGAKQN. Синтез пептидов осуществлен в “Русбиолинк” (Россия) твердофазным методом путем наращивания пептидной цепи начиная с С-конца. Очистку пептидов проводили с помощью высокоэффективной жидкостной

АНТИТЕЛА К ВГС ПРИ АНТИВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ

хроматографии на колонке Diasorb, 250×25 mm, C16 (“Биохиммак”, Россия). Корректность аминокислотной последовательности пептидов подтверждена масс-спектрометрическим анализом с использованием матрично-активируемой лазерной десорбцией-ионизацией на времяпролетном масс-спектрометре MALDI TOF/TOF (“Bruker”, Германия). Определение антител к пептидам выполняли методом иммуноферментного анализа в планшетах марки “Для иммунологических и биологических исследований” (“Медполимер”, Россия). Пептиды сорбировали в лунки из раствора с концентрацией 0,03 мг/мл в 0,05 М карбонатном буфере pH 9,25 при +4°C в течение 16 час. Оставшиеся свободными после сорбции участки поверхности лунок блокировали 1% (масса/объем) человеческим сывороточным альбумином в 0,05 М фосфатном буфере (pH 7,4) при +37°C в течение 1 часа. После промывки 0,05 М фосфатно-солевым буфером с 0,1% (объем/объем) твином-20, pH 7,4 планшеты инкубировали с сыворотками в разведении 1:8, при +37°C в течение 1 час. Далее выполняли стандартную процедуру иммуноферментного анализа, используя в качестве хромогена тетраметилбензидин. Оптическую плотность измеряли при длине волны 450 нм с помощью микропланшетного спектрофотометра Multiscan ELISA (“Titertek”, Финляндия). Пороговую ОП для каждого пептида рассчитывали как среднее арифметическое значение ОП от анализа 30 сывороток здоровых людей плюс 3-кратная величина среднеквадратичного отклонения. ОП сывороток здоровых людей находилась в пределах 0,026-0,143. Статистически значимые различия в группах больных рассчитывали с помощью χ^2 критерия Пирсона и t-теста Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Снижение содержания анти-ВГС IgM в процессе лечения. Анти-ВГС IgM выявлены у 75% больных в группах с ППР и НР терапии и у 65% пациентов из группы сравнения. Перед началом лечения различия в содержании антител в этих группах больных были статистически недостоверными (табл. 2). Диапазон титров анти-ВГС IgM для пациентов с НР терапии находился в пределах 1:4-1:64, для пациентов остальных групп – в интервале 1:4-1:32. Таким образом, мы не обнаружили различий ни в частоте выявления этих антител, ни в их содержании, ни в диапазоне титров между группами с первичным позитивным и негативным результатом терапии.

Таблица 2. Содержание антител к отдельным антигенам ВГС перед началом терапии в группах больных с разными результатами лечения.

Антиген	Группа с ППР (n=20)	Группа с НР (n=20)	Статистические параметры	Группа с УПР (n=15)	Группа с НР* (n=25)	Статистические параметры
Анти-ВГС IgM	1:5,2 ^а 2,380±0,232	1:10,1 3,334±0,715	p>0,05 t=1,269 ^б	1:5,5 2,454±0,248	1:9,9 3,316±0,286	p<0,05 t=2,277 ^б
Анти-кор IgG	1:4390 12,100±0,400	1:6654 12,700±0,272	p>0,05 t=1,240	1:3910 11,933±0,493	1:6936 12,760±0,240	p>0,05 t=1,509
Анти-NS3 IgG	1:621 9,278±0,774	1:375 8,550±0,627	p>0,05 t=0,781	1:656 9,357±0,796	1:395 8,625±0,634	p>0,05 t=0,719
Анти-NS4ab IgG	1:750 9,550±0,671	1:238 7,895±0,625	p>0,05 t=1,804	1:776 9,600±0,675	1:296 8,208±0,628	p>0,05 t=1,510
Анти-NS5a IgG	1:813 9,667±0,918	1:565 9,143±0,870	p>0,05 t=0,414	1:840 9,714±0,963	1:597 9,222±0,861	p>0,05 t=0,381

Примечание: а - Содержание антител дано как средний геометрический титр и log₂ его обратной величины со стандартной ошибкой среднего. б - Различия достоверны при t≥2,04; для остальных антител при t≥2,02.

В стартовой точке наблюдения частота обнаружения анти-ВГС IgM была близкой в группах с УПР (73%) и НР* (76%) терапии. Но в содержании этих антител были выявлены различия (табл. 2). Диапазон титров анти-ВГС IgM для группы с УПР составил 1:4-1:16, для группы с НР* – 1:4-1:64. Таким образом, наличие анти-ВГС IgM в титре 1:32 и выше в нашем исследовании было неблагоприятным серологическим признаком.

У всех пациентов с ППР и десяти больных с НР терапии в процессе лечения наблюдали снижение уровня анти-ВГС IgM (рис. 1). Наиболее интенсивным оно было в первые три месяца в группе с ППР и только в 1-й месяц терапии в группе с НР лечения. У пяти пациентов с НР терапии уровень этих антител был стабильным в течение всего периода наблюдения. Различие в ΔКП между группами с ППР и НР в конце 1-го месяца терапии достигло статистической достоверности ($0,652 \pm 0,183$ и $0,234 \pm 0,073$; $t=2,13$; $p<0,05$).

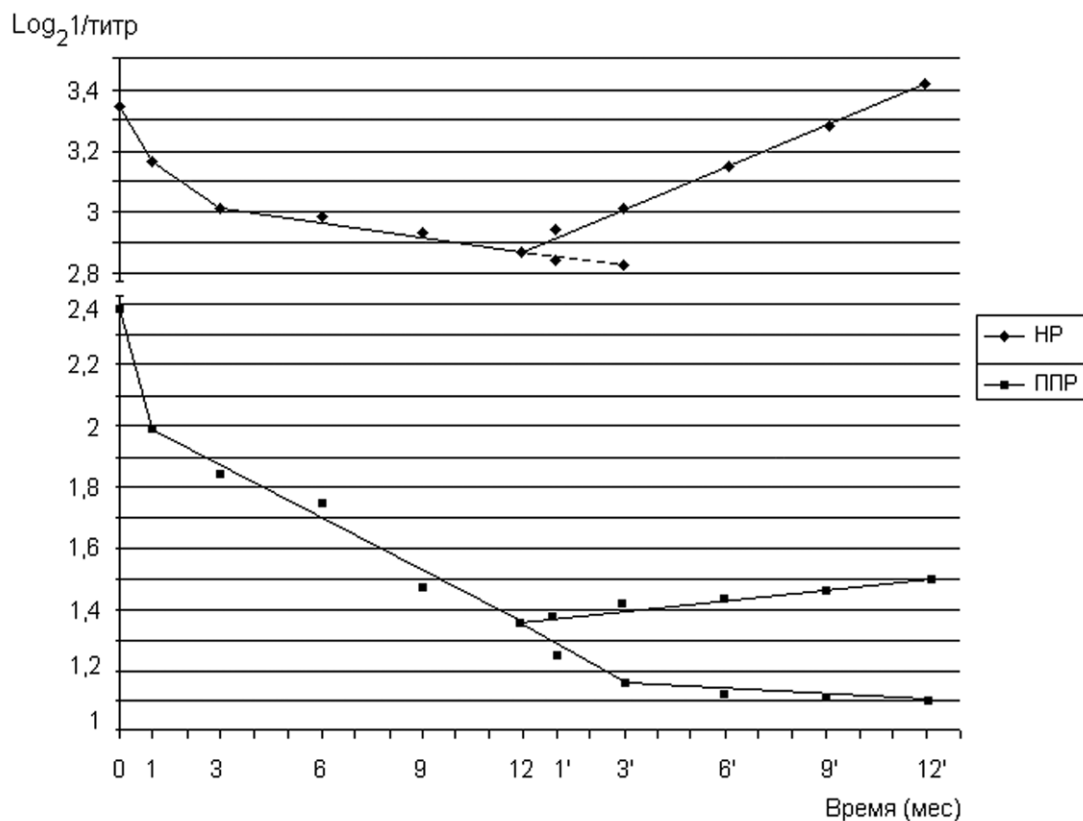


Рисунок 1.

Динамика содержания анти-ВГС IgM у пациентов с разным результатом лечения.

Факт снижения иммуноглобулинов М к антигенам кор, NS3, NS4ab после окончания лечения относительно стартового значения был показан ранее только для больных с УПР лечения [6-8, 17].

Изменение уровня анти-ВГС IgM после окончания лечения. В динамике уровня анти-ВГС IgM после окончания терапии были обнаружены две тенденции (рис. 1). В группе с ППР у части больных сохранилось снижение, у других – началось увеличение. Причем, если в 1-й месяц рост содержания анти-ВГС IgM наблюдался

у двух больных, то в 3-й месяц – у четырех пациентов, в 6-й месяц – у шести человек, у которых он продолжился до 12-го месяца. РНК ВГС была выявлена в сыворотке крови у пяти из этих шести пациентов в 6-й месяц и у шести больных в 12-й месяц. В группе с НР лечения у большинства участников в 1-ый месяц после окончания терапии было отмечено увеличение уровня анти-ВГС IgM, снижение сохранялось лишь у 3-х больных (рис. 1, пунктирная линия). В 3-й месяц эта тенденция была обнаружена у двух пациентов, но к 6-му месяцу она прекратилась.

Содержание анти-ВГС IgM в группе сравнения. В этой группе уровень анти-ВГС IgM, выраженный как \log_2 , составил $1,855 \pm 0,251$ в стартовой точке и $1,902 \pm 0,230$ в конце наблюдения. Следует отметить, что у семи больных было отмечено небольшое увеличение и у шести человек незначительное уменьшение содержания этих антител.

Снижение уровня анти-кор IgG в процессе лечения. Перед началом терапии в содержании анти-кор IgG не выявлено достоверных различий в лечебных группах (табл. 2). Диапазон титров антител для пациентов с первичным и устойчивым позитивным результатом составил 1:512-1:32768, а для больных с НР и НР* – 1:2048-1:32768. В 1-й месяц терапии у большинства пациентов (кроме одного с ППР и трёх с НР) наблюдалось снижение уровня этих антител. С 3-го месяца лечения этот эффект был обнаружен уже у всех больных. В 3-ий и 6-й месяцы терапии в группе с ППР снижение КП составило 0,455 и 0,399, в то время как в группе с НР – 0,305 и 0,119. Статистически значимые различия в ΔКП между группами с ППР и НР были обнаружены на 6-й месяц лечения ($0,991 \pm 0,131$ и $0,673 \pm 0,074$; $t=2,12$; $p<0,05$). В этот месяц суммарное снижение КП анти-кор IgG относительно стартового значения составило 0,860 и более для группы с ППР, а для группы участников с НР лечения 0,750 и менее.

Ранее факт снижения этих антител был показан для больных с УПР лечения [9, 10, 20, 21] и для некоторых пациентов с НР* терапии [21].

Изменение содержания анти-кор IgG после окончания лечения. После окончания терапии в динамике содержания анти-кор IgG были выявлены две тенденции, аналогично тому, как это было показано для анти-ВГС IgM. У большинства больных (17 человек) из группы с ППР в 1-3-й месяцы сохранилось снижение уровня этих антител. Но ΔКП анти-кор IgG с каждой последующей временной точкой становилось все меньше, и эта закономерность была характерна для всех анализируемых антител. У 4-х больных этой группы в 6-й и 12-й месяцы было отмечено увеличение уровня анти-кор IgG, которое сопровождалось появлением у них РНК ВГС. В группе с НР лечения в 1-й месяц после окончания терапии снижение анти-кор IgG сохранилось у шести больных, в 3-й месяц – только у одного пациента, у которого оно продолжилось до 12-го месяца. У остальных участников с НР лечения наблюдалось увеличение уровня этих антител.

Уровень анти-кор IgG в группе сравнения. В этой группе содержание анти-кор IgG было несколько ниже (средний геометрический титр 1:2286), чем в других группах (табл. 2). К концу исследования было выявлено слабое увеличение уровня этих антител у 10-и человек и незначительное снижение у остальных больных относительно начального значения. В результате, КП анти-кор IgG этой группы увеличился на 0,307 относительно стартовой величины.

Снижение содержания анти-NS3 IgG в процессе лечения. Во всех лечебных группах перед началом терапии не удалось выявить достоверных различий в содержании анти-NS3 IgG (табл. 2). Диапазон титров этих антител составил для больных с ППР 1:8-1:8192, для пациентов с УПР – 1:32-1:8192 и участников с НР и НР* лечения – 1:4-1:8192. В 1-й месяц терапии у всех пациентов было отмечено снижение анти-NS3 IgG, но интенсивность этого процесса была разной в группах больных. В процессе терапии ΔКП этих антител в группе больных с ППР колебалась в пределах 0,432-0,544, а у больных с НР лечения этот показатель стабильно снижался с 0,178 до 0,111. Статистически значимые различия в ΔКП анти-NS3 IgG между группами с ППР и НР лечения были обнаружены на 3-й

месяц терапии ($0,869 \pm 0,114$ и $0,295 \pm 0,061$; $t=4,45$; $p<0,001$). В этот месяц КП этих антител уменьшился относительно стартовой величины на 0,750 и более для группы с ППР и на 0,360 и менее для больных с НР лечения.

Ранее факт снижения анти-NS3 IgG после окончания интерферонотерапии был показан Park и соавторами для пациентов с УПР лечения и для некоторых больных с НР* терапии [21].

Изменение уровня анти-NS3 IgG после окончания терапии. В динамике уровня этих антител также было выявлено две тенденции. В 1-й и 3-й месяц после окончания лечения у 17-и больных из группы с ППР уровень анти-NS3 IgG уменьшился, у трех человек – увеличился. На 6-й и 12-й месяц рост содержания антител обнаружен у четырех больных этой группы, в крови которых также появилась РНК ВГС. В группе с НР лечения в 1-ый месяц после окончания терапии снижения этих антител было отмечено у 10-и больных, в 3-ий месяц – у семи, в 6-ой месяц – у трёх и в 12-ый месяц – у одного больного. У остальных участников этой группы наблюдался рост уровня этих антител.

Содержание анти-NS3 IgG в группе сравнения. Уровень антител к белку NS3 (средний геометрический титр 1:315) был несколько ниже, чем в других группах больных (табл. 2). К концу наблюдения у 11-и пациентов наблюдалось увеличение анти-NS3 IgG и у 9-и человек – легкое снижение. В результате среднее групповое КП этих антител превысило стартовое значение на 0,207.

Снижение уровня анти-NS4ab IgG в процессе лечения. Во всех лечебных группах перед началом терапии не выявлено статистически достоверных различий в содержании анти-NS4ab IgG, но самое высокое значение t-критерия Стьюдента обнаружено между группами с ППР и НР лечения (табл. 2). Диапазон титров этих антител для группы больных с ППР лечения составил 1:4-1:2048, для групп с НР и НР* – 1:4-1:8192 и для больных с УПР – 1:32-1:8192.

В процессе терапии уровень анти-NS4ab IgG снижался у всех больных. Но интенсивность этого процесса (оцененная по ΔКП) была самой большой в группе больных с ППР: в 1-й месяц – 0,527 и в 12-й месяц – 0,485. В это же время в группе с НР она составила 0,119 и 0,098. Статистически достоверное различие в падении уровня этих антител между группами с ППР и НР было обнаружено в 1-й месяц терапии ($0,527 \pm 0,135$ и $0,119 \pm 0,029$; $t=2,978$; $p<0,01$). В этот месяц КП анти-NS4ab IgG снизился относительно стартового значения более чем на 0,400 в группе с ППР, но менее чем на 0,150 у больных с НР лечения.

Наши результаты, представленные в таблице 2, не подтверждают данные Desombere и соавторов, которые обнаружили, что высокий уровень антител к антигену NS4a перед началом терапии коррелирует с устойчивым позитивным результатом лечения [16]. Возможно, расхождение вызвано тем, что мы использовали антиген NSab и изучали группы больных с разными генотипами вируса. В исследовании Desombere и соавторов были проанализированы антитела больных с одним генотипом ВГС. Однако эти авторы не объяснили причину, по которой высокий уровень анти-NS4a IgG коррелирует с позитивным результатом лечения. Снижение уровня антител к антигену NSab после интерферонотерапии у больных с УПР было отмечено ранее Yuki и соавторами [9].

Изменение уровня анти-NS4ab IgG после окончания лечения. После окончания терапии в лечебных группах выявлено как увеличение, так и снижение содержания анти-NS4ab IgG. Если в 1-й месяц после терапии содержание этих антител увеличилось у четырех больных с ППР, то к концу исследования – у шести человек. Причем РНК ВГС была обнаружена у пяти из них в 12-й месяц после окончания терапии. В группе с НР лечения эта тенденция была выявлена у 12-и человек в 1-й месяц и у 19-и больных в последний месяц наблюдения. У одного больного с НР терапии еще сохранялось небольшое снижение этих антител до 12-го месяца после окончания лечения.

Содержание анти-NS4ab IgG в группе сравнения. Стартовый уровень анти-NS4ab IgG (средний геометрический титр 1:133) в этой группе был ниже,

чем в других (табл. 2). К концу исследования у 11-и участников содержание этих антител увеличилось и у 9-и больных – снизилось. В результате КП анти-NS4ab IgG в этой группе больных увеличился на 0,355 относительно стартового значения.

Снижение уровня анти-NS5a IgG в процессе лечения. Перед началом лечения антитела к антигену NS5a не удалось обнаружить у одного больного с ППР, у шести пациентов с НР лечения ($\chi^2=1,406$; $p>0,05$) и у восьми человек из группы сравнения. Статистически значимых различий в содержании этих антител перед началом лечения не обнаружено (табл. 2). Диапазон титров анти-NS5a IgG составил для больных с ППР 1:4-1:16384, для участников с УПР – 1:8-1:32768 и для пациентов с НР и НР* – 1:4-1:32768. Интенсивность снижения КП в группе с ППР в течение всего курса терапии незначительно увеличилась с 0,298 до 0,366, а в группе с НР, напротив, – уменьшилась с 0,292 до 0,125. Статистически достоверное различие в снижении Δ КП анти-NS5a IgG между этими группами больных обнаружено в 12-й месяц лечения ($1,620\pm0,179$ и $1,159\pm0,098$; $t=2,26$; $p<0,05$). В этот месяц КП снизился относительно стартового значения на 1,440 и более в группе с ППР и в группе с НР лечения на 1,260 и менее.

Анти-NS5a IgG не удалось выявить у одного пациента с УПР и у семи человек из группы с НР* лечения ($t=1,93$; $p>0,05$, что приближается к $t_{0,95}=2,02$). Хотя, по нашим данным, различия не достигли уровня статистической достоверности, возможно, существует зависимость между обнаружением анти-NS5a IgG и позитивным результатом лечения, которую установили Frangeul и соавторы [14]. Как следует из таблицы 2, мы не обнаружили, что средний геометрический титр анти-NS5a IgG в группе больных с УПР лечения имеет более высокое значение, чем в группе пациентов с НР*, как это установлено Desombere и соавторами [16]. Возможно, нами не выявлена эта закономерность, потому что были исследованы антитела от больных с разными генотипами ВГС, а не с одним, как было сделано у отмеченных выше авторов. Но Desombere и соавторы не объяснили, почему пациенты с УПР лечения имеют более высокие титры этих антител.

Изменение уровня анти-NS5a IgG после окончания лечения. В динамике содержания анти-NS5a IgG наблюдалось как снижение, так и увеличение. В 1-й месяц после лечения снижение этих антител сохранилось у 14-и больных с ППР и у 2-х больных с НР лечения. К концу исследования этот эффект остался только у 9-и больных с ППР терапии. У остальных участников этих групп было отмечено увеличение содержания этих антител.

Содержание анти-NS5a IgG в группе сравнения. В этой группе уровень анти-NS5a IgG (средний геометрический титр 1:130) был ниже, чем в остальных группах (табл. 2). К концу исследования содержание этих антител увеличилось у семи человек и слегка уменьшилось у пяти пациентов. В результате КП анти-NS5a IgG в этой группе больных превысил стартовое значение на 0,238.

Снижение уровня антител к В-эпитопам 1-го ГВР в процессе лечения. Роль ВГС-нейтрализующих антител в формировании позитивного результата терапии не изучена. Известно, что один из нейтрализующих вирус эпитопов оболочечного белка Е2 находится в 1-м ГВР в его С-концевом участке [22, 23]. В нашем исследовании антитела к трем пептидам, моделирующим отдельные В-эпитопы 1-го ГВР, перед началом терапии были обнаружены у 8-и больных с ППР, у 11-и пациентов с НР лечения ($\chi^2=0,401$; $p>0,05$) и у 13-и человек из группы сравнения. Статистически значимых различий в КП антител к этим пептидам во всех группах больных перед началом терапии не обнаружено, но самое большое значение t -критерия было выявлено для КП антител к пептиду III (рис. 2). В процессе лечения содержание анти-пептидных IgG снизилось, но в конце курса терапии они все-таки детектировались. Наиболее интенсивно уменьшался уровень антител к пептиду III (С-концевой В-эпитоп 1-го ГВР). Достоверное различие в снижении содержания иммуноглобулинов G к этому пептиду было обнаружено в 12-й месяц терапии ($1,999\pm0,787$ и $0,358\pm0,057$; $t=2,08$; $p<0,05$). У больных с УПР и НР* частота выявления антител к трём пептидам и их КП различались незначительно ($p>0,05$).

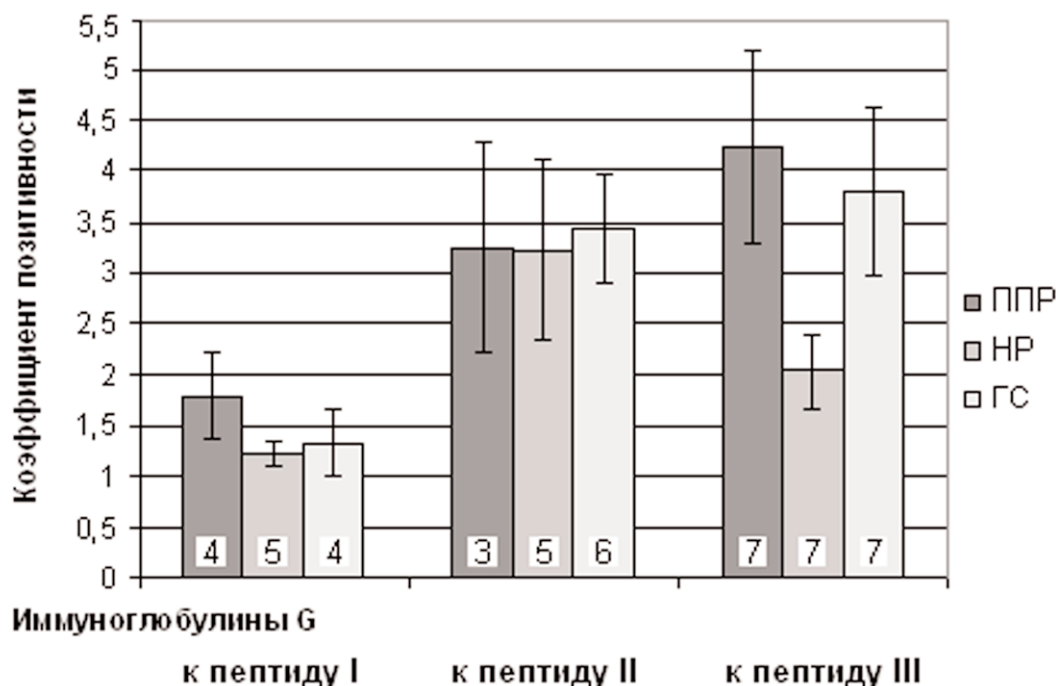


Рисунок 2.

Иммуноглобулины G к пептидам из 1-ого ГВР белка E2 в различных группах больных перед началом терапии. Использованы сокращения: ППР – группа с первичным позитивным результатом, НР – группа с негативным результатом, ГС – группа сравнения. В столбцах цифрами отмечено количество положительных образцов. Различие в КП антител к пептиду III не достигло статистической достоверности ($t=1,815$ вместо необходимого значения 2,18).

Таким образом, наши данные не подтверждают результаты Chu и соавторов, которые используя иммуноблоттинговый тест для выявления антител к 1-му ГВР, показали зависимость между высоким уровнем этих антител до терапии и устойчивым позитивным результатом лечения [15]. Недостатком этого исследования было то, что количественную оценку данных анализа выполняли визуально по 4-х балльной системе (1, 2, 3, 4), что по чувствительности уступает нашему тесту. Учитывая, что ВГС-нейтрализующие антитела могут вносить вклад в снижение виремии и способствовать формированию позитивного результата при антивирусной терапии, их роль нуждается в дальнейшем изучении.

Изменение содержания антител к пептидам из 1-го ГВР после окончания лечения. После окончания терапии у пациентов с ППР уровень антител к трем пептидам оставался стабильным или слегка снижался, в то время как у больных с НР – только увеличивался.

Уровень антител к пептидам из 1-го ГВР в группе сравнения. У пациентов этой группы содержание антител к пептидам в процессе всего периода наблюдения оставалось стабильным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Нами показано, что уже в процессе антивирусной терапии происходит снижение содержания иммуноглобулинов М и G к антигенам ВГС (кор, NS3, NS4ab, NS5a), а также к отдельным В-эпитопам консенсусной последовательности 1-го ГВР оболочечного белка E2. В группе без этиотропного лечения, напротив, наблюдался постепенный рост содержания

специфических антител. В конце 1-го месяца терапии были обнаружены самые ранние статистически достоверные различия в уменьшении уровня анти-ВГС IgM и анти-NS4ab IgG между больными с ППР и НР лечения. В 3-й месяц лечения достоверные различия наблюдались в снижении анти-NS3 IgG, в 6-й месяц – в уменьшении анти-кор IgG и в 12-й месяц – в снижении анти-NS5a IgG и антител к С-концевому В-эпиту из 1-го ГВР белка Е2. Три последних показателя неудобны для практического использования из-за позднего появления.

При решении вопроса о прекращении терапии приходится опираться на результаты количественного анализа РНК ВГС через 3 месяца после начала лечения [24]. Но уже в конце 1-го месяца терапии по изменениям в содержании анти-ВГС IgM и анти-NS4ab IgG можно прогнозировать исход лечения. Дополнительным позитивным серологическим признаком является снижение анти-NS3 IgG через 3 месяца после начала терапии. У большинства больных с ППР сохраняется снижение уровня антител к белкам ВГС и после окончания терапии, хотя интенсивность этого процесса постепенно замедляется. Группа больных с НР лечения гетерогенна по динамике антител к антигенам ВГС, у некоторых из них после окончания лечения еще наблюдалось снижение уровня специфических иммуноглобулинов. Вероятно, таким пациентам необходимо подбирать индивидуальный курс терапии.

По нашим данным, единственным серологическим маркером, предсказывающим большую вероятность негативного результата лечения ещё до его начала, являются анти-ВГС IgM в титре 1:32 и более. Известно, что эти антитела отражают появление новых антигенных вариантов вируса. Очевидно, при высокой частоте мутаций в РНК ВГС невозможно достичь позитивного результата терапии. Возможно, существуют зависимости, тенденции которых в нашем исследовании наблюдались, между первичным позитивным результатом лечения и более высоким содержанием антител к С-концевому пептиду 1-го ГВР, к антигену NS4ab и наличием антител к белку NS5a перед началом терапии. В заключение отметим, что:

1. Антивирусная терапия гепатита С сопровождается снижением уровня специфических антител в процессе лечения.
2. Эффективность антивирусной терапии ХГС можно определить по интенсивности снижения анти-ВГС IgM, анти-NS4ab IgG и анти-NS3 IgG в первые три месяца лечения.
3. Единственным серологическим предикторным маркером негативного результата терапии ХГС еще до ее начала является содержание анти-ВГС IgM в титре 1:32 и более.

Авторы благодарны профессору Е.Ф. Колесановой за важные критические замечания по тексту статьи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wasley A., Alter M.A. (2000) *Semin. Liver Dis.*, **20**, 1-6.
2. Chisari F.V. (2005) *Nature*, **436**, 930-932.
3. Mikkelsen M., Bukh J. (2007) *Curr. Infect. Dis. Rep.*, **9**, 94-101.
4. Robbins P.W., Myers G., Howard C., Brettin T., Bukh J., Gasschen B., Gojobori T., Maertens G., Maertens G., Mizokami M., Nainan O., Netesov S., Nishioka K., Shini T., Simmonds P., Smith D., Stuyver L., Weiner A. (1998) *Arch. Virol.*, **143**, 2493-2503.
5. Simmonds P., Holmes E.C., Cha S.-W., McOmish F., Irvine B., Beall E., Yap P.L., Kolberg J., Urdea M.S. (1993) *J. Gen. Virol.*, **74**, 2391-2399.
6. Brillianti S., Masci C., Ricci P., Miglioli M., Barbara L. (1992) *Hepatology*, **15**, 998-1001.
7. Quiroga J.A., van Binsbergen J., Wang C.Y., Paardo M., Navas S., Trines C., Herrero M., Carreno V. (1995) *Hepatology*, **22**, 1635-1640.

8. Pawlotsky J.M., Roudot-Thoraval F., Bastie A., Darthuy F., Remire J., Metreau J.M., Zafrani E.S., Duval J., Dhumeaux D. (1996) *J. Infect. Dis.*, **174**, 1-7.
9. Yuki N., Hayashi N., Hagiwara H., Naito M., Kasahara A., Fusamoto H., Kamada T. (1994) *J. Hepatol.*, **20**, 421-425.
10. Kao J.H., Lai M.Y., Chen P.J., Chen D.S. (1997) *J. Formos. Med. Assoc.*, **96**, 825-828.
11. Yuki N., Hayashi N., Mita E., Hagiwara H., Oshita M., Ohkawa K., Katayama K., Fusamoto H., Katamada T. (1995) *J. Med. Virol.*, **45**, 162-167.
12. Yoshimura E., Hayashi J., Kishihara Y., Yamaji K., Kinukawa N., Kashiwagi S. (1996) *Dig. Dis. Sci.*, **41**, 155-160.
13. Sakugawa H., Nakasone H., Nakayoshi T., Kawakami Y., Kinjo F., Saito A., Nakayoshi T., Yamashira A. (1998) *Microbiol. Immunol.*, **42**, 299-303.
14. Frangeul J.L., Cresta P., Perrin M., Duverlie G., Khorsi H., Musset L., Opolon P., Hureau J.M., Lunel F. (1998) *Hepatology*, **28**, 538-543.
15. Chu C.M., Sheen I.S., Liaw Y.F. (2004) *Infection*, **32**, 153-156.
16. Desombere I., Van Vlierberghe H., Weiland O., Hultgren C., Sallberg M., Quiroga J., Carreno V., Leroux-Roels G. (2007) *J. Med. Virol.*, **79**, 701-713.
17. Tabone M., Secreto P., Marini C., Bonardi R., Boero M., Taraglio S., Ercole E., Sallio B.F., Pera A. (1997) *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, **9**, 287-291.
18. Nikolaeva L.I., Blokhina N.P., Tsurikova N.N., Voronkova N.V., Miminoshvili M.I., Braginsky D.M., Yastrebova O.N., Booyinskaya O.B., Isaeva O.V., Michailov M.I. (2002) *J. Viral. Hepat.*, **9**, 429-437.
19. Sobolev B.N., Poroikov V.V., Olenina L.V., Kolesanova E.F., Archakov A.I. (2002) *J. Viral. Hepat.*, **7**, 368-374.
20. Urushihara A., Sodeyama T., Matsumoto A., Tanaka E. (1994) *J. Med. Virol.*, **42**, 348-356.
21. Park Y.M., Byung B.H., Choi J.Y., Bae S.H., Kim B.S., So H.-S., Ryu W.S. (1999) *J. Korean Med. Sci.*, **14**, 165-170.
22. Farci P., Shimoda A., Wong D., Cabezon T., De Gioannis D., Strazzer A., Shimizu Y., Shapiro M., Alter H.J., Purcell R. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 15394-15399.
23. Owsianka A., Tarr A.W., Juttla V.S., Lavillette D., Bartosch B., Cosset F.-L., Ball J.K., Patel A.H. (2005) *J. Virol.*, **79**, 11095-11104.
24. Strader D.B., Wright T., Thomas D.L., Seeff L.B. (2004) *Hepatology*, **39**, 1147-1171.

Поступила: 03. 07. 2008.

DECLINE OF ANTIBODIES TO HEPATITIS C VIRUS DURING ANTIVIRAL THERAPY

*L.I. Nikolaeva¹, V.V. Makashova², E.V. Petrova³, G.A. Shipulin², E.I. Samokhvalov¹,
A.K. Tokmalaev⁴, D.K. Lvov¹*

¹D.I. Ivanovsky Institute of Virology, Russian Academy of Medical sciences, Gamaleya ul., 16, Moscow, 123098 Russia; tel: +7 499 190 30 50; e-mail: L.I.Nikolaeva@mail.ru

²Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

³⁴ Hospital of Infection Diseases, Moscow, Russia

⁴Russian Peoples' Friendship University, Moscow, Russia

The goal of this study was to investigate interrelationship between changes in anti-hepatitis C virus antibody and response to antiviral therapy. The comparative quantitative analysis of antibodies to individual structural and nonstructural viral proteins was done during two years in three patient groups: initial responders, non-responders and a reference group (without therapy). All patients in the treated groups exhibited decrease in the analyzed antibodies to HCV proteins, but with different patterns. The first statistically significant difference in the decrease of virus-specific antibody between initial responders and non-responders was observed within the first three months of therapy beginning. Some treated patients demonstrated decrease in antibody levels to HCV proteins after the end of therapy.

Key words: hepatitis C, antiviral therapy, antibody.