

VIRAL INFECTIONS

Imunomodulačné a mikrobicidné efekty polyoxidonia pri liečení HIV infekcie

VÚ klinickej imunológie Rostovskej štátnej lekárskej univerzity, Rostov-na-Donu

Nehľadiac na prudký rozvoj výskumov týkajúcich sa problému HIV-infekcie, ako aj dosiahnuté úspechy lekárskej vedy a praxe až po dnešok, nedokazali však zastaviť rozvoj pandémie HIV-infekcie ako aj vypracovať účinné metódy prevencie a liečenia. Podľa prognózy WHO na začiatku 3. tisícročia na celom svete bude viac ako 40 miliónov HIV-infikovaných(6,7). Tento problém je tým najväčším a stáva sa akútny dnes aj v Rusku. Na pozadí už existujúcej na juhu Ruska veľkej skupiny detí, ktoré sa infikovali parenterálnym spôsobom v priebehu rokov 1988 - 1989, v posledných rokoch je v tomto regióne a priliehajúcich okresoch možné pozorovať rast počtu HIV-infikovaných medzi dospelým obyvateľstvom – tak u narkomanov, ako aj sociálne zabezpečených ľudí, čo bezpochyby vedie k zvýšeniu počtu detí, infikovaných vertikálnou cestou(4). Rýchle šírenie HIV-infekcie, ťažký postupujúci priebeh, vysoká letálnosť stavajú pred zdravotníctvo vážne úlohy, týkajúce sa prevencie a liečenia tohoto ochorenia.

V posledných rokoch, znepokojivou tendenciou epidemiológie HIV je vysoká frekvencia heterosexuálnej cesty prenosu vírusu - 70-80%(1). To je sprevádzané značným zvýšením počtu HIV-infikovaných žien v reprodukčnom veku a teda zvýšením počtu detí, nakazených transplacentárne, čo ohrozuje zdravie národa(5).

Úspešné potlačenie replikácie HIV pomocou mohutnej protivírusovej terapie umožňuje sústrediť úsilie na obnove funkcie imunitného systému pomocou zapojenia do schém liečby preparáty s imunomodulačnou aktivitou. Využitie imunomodulátorov a faktorov, ktoré stimulujú kolónie pri liečení HIV-infikovaných je doteraz diskutabilné v pláne novej aktivácie vírusovej replikácie. Avšak v poslednom štádiu ochorenia, pri formovaní generalizovaných septických stavov vzniká nutnosť ich použitia.

Tak zvýšenie mikrobicidnej aktivity sliznice pošvy žien pri heterosexuálnych kontaktoch s HIV-infikovanými partnermi sa nám vidí ako najperspektívnejšia cesta ochrany pred infikovaním žien reprodukčného veku. Jedným z najmodernejších imunomodulátorov je polyoxidonium, ktorý zlepšuje kooperáciu T- a B- lymfocytov, a tým vlastne „supluje“ porušenú funkciu CD3⁺ a CD4⁺ - lymfocytov, ktoré sú základnou terčovou bunkou pre HIV. Okrem toho, polyoxidonium zvyšuje funkčnú aktivitu makrofágov a neutrofilov, má detoxikačný vplyv(3). Polyoxidonium je vysokomolekulárny fyziologicky aktívny polymér s jasne vyjadrenou imunotropiou s mohutným stimulačným pôsobením na bunky fagocytárneho systému - monocyty a neutrofilý, čo vedie k zosilneniu syntézy cytokínov a fagocytov, cytotoxicity NK - buniek. Preparát má nie iba imunotropnú, ale aj výraznú antitoxickú aktivitu, ktorá sa určuje vysokými adsorbčnými vlastnosťami(2).

Polyoxidonium je schopný blokovať jednak rozpustné toxické látky, ako aj mikročastice, ktoré majú toxické pôsobenie na živé bunky; zvyšuje odolnosť bunkových

membrán voči cytotoxickému pôsobeniu a takto znižuje toxicitu liekových preparátov pri ich spoločnom podávaní.

Tento fakt je určujúci pri predpisovaní HIV-infikovaným chorým pri tri- alebo kvadroantiretrovirusovej terapii, ktorá, ako je známe, je značne hepato- a nefrotoxická. To znamená, že v mnohých prípadoch polyoxidonium je výberovým preparátom.

Materiály a metódy. Pozorovali sme 39 žien vo veku od 19 do 35 rokov. Pacientky boli rozdelené do dvoch skupín: 1. skupina - 14 žien bolo z diskordantných (nezhodných) manželských párov, séronegatívne na HIV-infekciu, ale ktoré žijú v stabilnom manželstve s HIV-infikovanými mužmi bez použitia prezervatívov. Pacientky 1. skupiny boli evidované ako kontaktné pre HIV-infekciu a dostávali preventívnu liečebnú kúru s použitím polyoxidonia vo forme vaginálnych čípkov - po 1 čípku (kúra 10 čípkov). V 2. skupine bolo 25 HIV-infikovaných žien v štádiu IIIA a IIIB. Diagnóza HIV-infekcie bola stanovená na základe klinických údajov a zistenia špecifických protilátok na HIV-1 (IFA) i k jeho jednotlivým bielkovinám a glykoproteínom (imunoblot „Du Pont“).

Pacientky 2. skupiny dostávali bázovú terapiu: antiretrovirusové preparáty, neupogén v spojení s inhibítormi proteáz, antibakteriálne a protipliesňové prostriedky, detoxikačnú terapiu, vitamíny, hepatoprotektory a enterosorbenty. Do komplexného liečenia bol zapojený aj preparát polyoxidonium vo forme vaginálnych čípkov - po 1 čípku (kúra 10 čípkov).

Pacientky boli vyšetrené pred začiatkom liečenia a po dvoch týždňoch a potom po 1,5 mesiaci po skončení liečenia. Bola vyšetrená krv z lakt'ovej žily a stery zo slizničnej blany pošvy. Pre všetky imunologické testy sa používali mononukleárne krvné bunky, vylúčené na gradientu hustoty fikoll-verografie. Počet CD3⁺-, CD4⁺-, CD16⁺-, CD20⁺-, CD25⁺-, CD95⁺-, CD11b - lymfocytov sa skúmal pomocou reakcie nepriamej imunofluorescencie s použitím príslušných monoklonálnych protilátok (MP „Sorbent“, Moskva). Evidencia získaných výsledkov sa vykonávala na laserovom prietokovom cytofluorimetri EPIX-XL Coulter (Francúzsko). Na získanie monocytov periférnej krvi sa používala metóda adhézie buniek, ktoré sa prilepili ku sklu. Stanovenie expresie receptorov voči Fc-fragmentu IgG (FcγR - receptorov) a C3b - fragmentu komplementu (C3bR - receptorov) na membráne makrofágov a neurofilov krvi sa vykonávalo pomocou nepriamej imunofluorescencie s použitím monoklonálnych protilátok (CD16, CD11b), značkových FITC. Vyčlenenie rezidentných makrofágov zo stery sliznice pošvy sa vykonávalo podľa metódy H. Recalde (1984). Skúmala sa expresia FcγR- a C3bR - receptorov na membráne rezidentných makrofágov sliznice pošvy, ako aj fagocytárna aktivita a intenzita oxidačno-redukčných procesov v rezidentných monocytoch. Množstvo infikovaných HIV mononukleárov periférnej krvi (provírusová krvná záťaž) a rezidentných makrofágov sa skúmalo metódou amplifikácie nukleínových kyselín polymeráznej reťazovej reakcie (PCR). Takisto sa vykonával výskum expresie markerov skoršej a neskoršej aktivácie; stanovenie intenzity procesov apoptózy ohľadne obsahu degradovanej DNA v lymfocytoch, makrofágoch a neurofiloch; stanovenie koncentrácie imunoglobulínov v krvnom sére triedy A, M, G metódou radiálnej imunodifúzie v gélu podľa Manchini (1965).

Výsledky a diskusia. V 1. skupine u žien, kontaktných s HIV-infekciou, v imunitnom statusu po použití polyoxidonia sa pozorovalo podstatné zvýšenie množstva CD3⁺-, CD4⁺-lymfocytov (do 49,5 ± 3,8%) a zníženie obsahu CIK (do 61,7 ± 4,7 mer. jedn.). Okrem toho sa zvyšovala metabolická aktivita makrofágov krvi (115 ± 3,5 mer. jedn.) a jej adaptačné možnosti (1,8 ± 0,2), ako aj expresia receptorov voči Fc- fragmentu IgG (FcγR 35,3 ± 2,1%) a C3b - komponentu komplementu (C3bR 43,6 ± 2,1%) na membráne týchto buniek.

Východiskový bakteriálny výsev z pošvy u pacientiek bol charakteristický zvýšením stupňa mikróbného osemenenia do 10⁷ - 10⁹ KOE/ml. V mikróbnjej flóre prevládali zlatý a epidermálny stafilocok, *Bacterium coli communis*, Proteidae, anaeróby.

Už po zavedení 1 - 2 čípkov všetky pacientky pozorovali zmiznutie svrbenia a pálenia, nepríjemných pocitov. Je treba poznamenať, že u tých, ktoré v minulosti mali príznaky nešpecifickej kolpítidy (zápal pošvy) a cervicitídy (zápal maternicového krčka), po použití čípkov polyoxidonia sa zmenšoval opuch a hyperémia sliznice pošvy. Použitie polyoxidonia vo forme pošvových čípkov umožnilo znížiť mikróbnu osemenenie pošvy na úroveň normálnych ukazovateľov ($10^3 - 10^4$ KOE/ml). Pritom bolo možné pozorovať normalizáciu expresie receptorov rezidentných makrofágov voči Fc- fragmentu IgG (FcγR $28,5 \pm 0,9\%$) a C3b - komponentu (C3bR $45,6 \pm 15\%$) na pozadí zvýšenia intenzity metabolizmu, závislého na kyslíku ($119 \pm 1,2$ mer. jedn.) a adaptačných zdrojov makrofágov sliznice pošvy ($1,65 \pm 0,1$ mer. jedn.) (tab. 1).

Tabuľka 1: **Dynamika expresie rezidentných makrofágov pošvy a cervikálneho kanála**

Doba vyšetrenia	FcγR, %	C3bR, %	Fagocyt. index	Fagocyt. číslo	CPAM	K _{stim}
Pred liečením	19,2	30,3	20,8	1,15	70,1	1,31
Po 2 týždňoch	28,5	45,6	26,5	1,58	121,3	1,6
Po 6 týždňoch	29,5*	43,2*	28,7	1,50	106,4	1,65*

Poznámka: tu, ako aj v tabuľkách 2, 3: hviezdička - signifikantný rozdiel v ukazovateľoch podľa Mann-Witny-Wilcoxon.

Pri kolposkopii bolo zistené vymiznutie opuchu a hyperémie, sliznica pošvy a pošvovej časti maternicového krčku dostali obvyklé bledo-ružové zafarbenie. Teda polyoxidonium má baktericidnú a imunotropnú aktivitu pri lokálnom použití. Je treba zvlášť poznamenať ten fakt, že v priebehu roka HIV-infekcie u žien nebola zaregistrovaná, nehľadiac na to, že mali stále HIV-infikovaných pohlavných partnerov, ktorí nepoužívali prezervatív. Nebola zistená prítomnosť vedľajších účinkov pri použití polyoxidonia vo forme vaginálnych čípkov. Vyšetrované pacientky tejto skupiny sú na dispenzarovom pozorovaní pre kontrolu mikrobicidnej aktivity polyoxidonia vo forme vaginálnych čípkov.

U pacientiek 2. skupiny, ktoré sú v stacionárnom liečení, už po 2 týždňoch po použití polyoxidonia bolo pozorované hodnoverné podstatné zvýšenie počtu CD4⁺- lymfocytov (do $36,0 \pm 7\%$), zvýšenie imunoregulačného indexu (do $1,66 \pm 0,81$) a zníženie obsahu CIK (do $90,7 \pm 21,9$ mer. jedn.) (tab. 2).

Tabuľka 2: **Dynamika niektorých ukazovateľov imunitného statusu HIV-infikovaných pri liečení polyoxidoniom ($M \pm m$)**

Doba vyšetrenia	CD4 ⁺ , %	CD8 ⁺ , %	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CD16 ⁺ , %	Lg protivi-virusového zaťaženia	Protivi-virusové zaťaženie, genómov na 10 ⁷ buniek	Protivi-virusové zaťaženie/apoptóza	% apoptózy	RBTL, %	CIK, mer. jedn.
Pred liečením	29,0±9,7	27,8±8,2	1,18±0,48	8,2±1,9	2,8±0,6	684±234,4	0,9±0,2*	13,0±1,3	29,3±11,0	204,3±87,4
Po 2 týždňoch	23,2±2,0	25,8±1,3	0,94±0,16	9,6±4,9	3,3±0,8*	3250±112,5*	0,6±0,2*	15,4±1,3*	32,5±5,4	104,4±18,3
Po 6 týždňoch	36,0±7,0*	24,4±2,9	1,66±0,81*	4,4±0,8*	2,3±0,8*	216±74,7*	1,4±0,1*	9,8±2,6*	39,4±2,8*	90,7±21,9*

Okrem toho sa zvyšovala metabolická aktivita makrofágov ($134,7 \pm 9,3$ mer. jedn.) a jej adaptačné možnosti ($1,53 \pm 0,06$), ako aj expresia receptorov voči Fc-fragmentu IgG (FcγR $30,3 \pm 2,7\%$) a C3b-komponentu komplementu ($40,5 \pm 2,1\%$) na membráne týchto buniek (tab. 3).

Tabuľka 3: **Dynamika imunologických ukazovateľov v liečení polyoxidoniom HIV-infikovaných žien ($M \pm m$)**

Doba vyšetrenia	NST _{spont}	NST _{stim}	K _{stim}	FcR, %	C3bR, %	Fagocyt. index	Fagocyt. číslo	CPAM	K _{stim}
Pred liečením	130,7±13,7	177,8±15,0	1,39±0,13	23,8±2,4	33,0±1,3	25,5±1,6	1,34±0,05	79,8±8,8	1,4±0,02
Po 2 týždňoch	134,7±9,3	187,3±10,8	1,4±0,1*	30,3±2,7*	40,5±2,1*	29,3±2,0	1,37±0,02*	108,0±6,5*	1,43±0,03*
Po 6 týždňoch	126,6±13,8	188,0±13,7	1,52±1,19*	22,3±2,4	30,0±2,7	25,0±1,6	1,46±0,03*	88,7±9,1	1,53±0,06*

Je treba poznamenať, že zahrnutie polyoxidonia do komplexnej terapie ochorenia viedlo k zníženiu provírusovej záťaže krvi z $2,8 \pm 0,6$ po $2,3 \pm 0,8$ $\text{lg}/10^7$ buniek ($p < 0,05$). Bolo zistené, že provírusová záťaž mononukleárov periférnej krvi sa značne zmenšila (z $684 \pm 234,4$ na $216 \pm 74,7$ genómov na 10^7 buniek). Pritom sa podobne zmenšila aj provírusová záťaž rezidentných makrofágov sliznice pošvy (z 344 po 38 genómov na 10^7 buniek). Bolo zistené, že zapojenie polyoxidonia do komplexného liečenia pacientov viedlo k rýchlejšiemu, a to v priebehu 8 - 10 dní, vymiznutiu symptómov intoxikácie a miestnych prejavov bakteriálnych infekcií.

Liečenie druhotných ochorení, ktoré vznikajú u pacientov s HIV-infekciou predstavujú vážny problém pre klinikov a imunológov. Údaje, ktoré sme získali svedčia o tom, že kombinovaná HAART- terapia v spojení s mocnými antibakteriálnymi a inými preparátmi nie vždy sú efektívne pri rozvoji ťažkých septických komplikácií v terminálnych štádiách HIV-infekcie. To je spojené s veľmi hlbokými imunopatologickými poruchami, ktoré sa rozvíjajú v rôznych etapách tohoto obávaného ochorenia. Na pozadí prehĺbenia imunologických porúch hnisavo-septickej komplikácie, ktoré sú u HIV-infikovaných osôb charakteristické ťažkým priebehom, častým rozvojom komplikácií a prechodom do generalizovanej sepsy, ktorá môže skončiť letálne.

To je základ pre zapojenie do komplexnej terapie imunomodulátorov. Výskumy, ktoré sme vykonali ukazujú, že pri predpísaní tri- alebo kvadroantivírusovej terapie, ktorá je mimoriadne hepato- a nefrotoxická, výberovým preparátom je polyoxidonium, ktorý má vlastnosť aktivovať ako bunkovú tak i humorálnu imunitu, zároveň má aj výrazné detoxikačné pôsobenie. U chorých, ktorí dostávali v komplexe liečenia polyoxidonium, dosť rýchlo mizli symptómy bakteriálnych infekcií. Na pozadí používania polyoxidonia u týchto chorých sa pozorovala rýchla remisia. Priaznivý priebeh ochorenia je spojený s kladnými posunmi zo strany imunitného stavu. Pritom sa pozorovalo zvýšenie počtu CD3^+ - a CD4^+ -lymfocytov a imunoregulačného indexu, zvýšenie metabolickej aktivity neutrofilov a makrofágov, jej adaptačných možností, ako aj množstvo buniek, ktoré expresujú na svojom povrchu receptory pre Fc-fragment IgG a C3b-komponentu komplementu. Pri používaní čípkov polyoxidonia u séronegatívnych pacientov z diskordantných manželských párov sa pozorovala normalizácia expresie receptorov rezidentných makrofágov voči Fc-fragmentu IgG a C3b-komponentu na pozadí zvýšenia metabolizmu a adaptačných zdrojov makrofágov sliznice pošvy.

Zvlášť dobrým výsledkom pri našich výskumov je ten fakt, že v priebehu roka HIV-infikované séronegatívnych žien sme neregistrovali, nehľadiac na to, že mali stálych HIV-infikovaných manželov, ktorí nepoužívali prezervatív.

Tieto údaje sú bezpochyby značne nádejné a zasluhujú ďalší výskum.

Literatúra:

1. Karaulov A.V. Klinická imunológia. –M., 1999.
2. Nekrasov A.V., Puchkova N.G.// Domáci imunomodulátor „Polyoxidonium“: mechanizmus účinku a klinické použitie. M., 2000. – s.4-6
3. Pinegin B.V.// tam isto s.6-8
4. Pokrovskij V.V. Epidemiológia a profílaktika HIV-infekcie a AIDS. –M., 1999
5. Sizjakina L.P., Černišov V.N., Cimovarian E.N. HIV-infekcia u detí. Rostov n/Donu, 2001
6. Blom J., Nielsen C.// Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. -1993. Vol.101. s.672-680
7. Fauci A.S. Host factor and the pathogenesis of HIV-induced disease // Nature. 1996. Vol.384. s.529-534