

личных компаниях, дифференцировать истинных производителей, следить за результатами клинических исследований аналогичных лекарств и опираться на собственный опыт лечения (*рис. 6*).

Выводы

В российских экономических условиях на современном этапе развития здравоохранения использование генерических препаратов в клинической практике представляется оправданным как с медицинских, так и с экономических позиций. Особое внимание при выборе препаратов следует уделять качеству производимых медикаментов, соблюдению производителем стандартов и процедур эквивалентности. В процессе лечения необходимо проводить мониторинг эффективности назначенной терапии и поиск причин неэффективности, в том числе учитывать связь с препаратом. Среди препаратов УДХК интересным представляется использование препарата Урсосан, производимого из высококачественной субстанции, с высоким уровнем качества производства по европейским стандартам.



Список литературы

1. Белая Ж.Е., Рожистая Л.Я. Дженерики в терапии постменопаузального остеопороза // РМЖ. 2011. № 29. С. 1419.
2. Верткин А.Л., Талибов О.Б. Генерики и эквивалентность — что стоит за терминами // Неотложная терапия. 2004. № 1–2. С. 16–17.
3. Герасимов В.Б., Лукьянов С.В. Еще раз к вопросу о дженериках // Фармацевтический вестн. 2004. № 18. С. 339.
4. Дробижев М.Ю. Бренды и генерики: аргументы и факты // Психиатрия и психофармакотерапия. 2007. Т. 9, № 3.
5. Дробижев М.Ю. Что мешает широкому распространению воспроизведенных лекарственных средств в клинической практике // Психиатрия и психофармакотерапия. 2006. Т. 11, № 2.
6. Ершова А.К. К вопросу о лечебных свойствах дженериков и оригинальных препаратов на примере центральных холинергических веществ // РМЖ. 2011. № 29. С. 1824.
7. Житникова Л.М. «Новые статины» — новые возможности для врача и пациента // РМЖ. 2011. № 29. С. 1832.
8. Лупанов В.П. Амлодипин и его дженерики в лечении больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями // РМЖ. 2010. № 22. С. 1322.
9. Марушкин Д.В., Раевская Л.Г. Выбор препаратов вальпроевой кислоты в терапии эпилепсии: оригинальный препарат или дженерик? // Лечащий врач. 2009. № 9.
10. Марцевич С.Ю., Кутищенко Н.П., Деев А.Д. Оригинальные препараты и дженерики в кардиологии. Можно ли решить проблему взаимозаменяемости? // Вестник Росздравнадзора. 2009. № 4. С. 5–8.
11. Марцевич С.Ю., Кутищенко Н.П., Деев А.Д. Как практическому врачу разобраться в многообразии дженериков? // Российский кардиологический журнал. 2005. № 1. С. 67–69.
12. Мередит П.А. Замена оригинальных медикаментозных препаратов на генерики: биоэквивалентность и терапевтическая эквивалентность различных солей амлодипина // РМЖ. 2009. № 18. С. 1150.
13. Недогода С.В., Петров В.И. Доказательная медицина и медицинская реклама // Справочник поликлинического врача. 2010. № 12.

14. Недогода С.В., Цома В.В. Как повысить приверженность к терапии статинами и снизить ее стоимость в условиях реальной клинической практики // РМЖ. 2008. № 29. С. 1912.
15. Нусс Ф., Тэйлор Д., Херт М. Альтернативное лечение шизофрении непатентованными аналогами фирменных препаратов — генериками. Перспективн или опасно? // Психиатрия и психофармакотерапия. 2006. Т. 8, № 1.
16. Остроумова О.Д., Бондарец О.В., Шорникова Е.Г. Действительно ли дешевле лечить больных артериальной гипертензией генерическими препаратами? // Справочник поликлинического врача. 2009. № 4. С. 3–6.
17. Перова Н.В. Генерики статинов — критерии выбора // Справочник поликлинического врача. 2008. № 6.
18. Подолков В.И. Тарзиманова А.И. Амлодипин в лечении артериальной гипертензии: всегда ли генерик эквивалентен оригинальному препарату? // РМЖ. 2010. № 9. С. 556.
19. Тарловская Е.И. Генерики и оригинальные препараты: взгляд со стороны практического врача // РМЖ. 2008. Т. 16, № 5. С. 333–338.
20. Теплова Н.В., Евсиков Е.М. Фармакоэкономическая эффективность нового генерика аторвастатина у больных с гиперлипидемией // РМЖ. 2006. № 2. С. 122.
21. Торопцова Н.В., Никитинская О.А. Реальная клиническая практика: насколько оправдано назначение генериков // Неврология. 2010. № 2.
22. Хупер И.Т., Ален Е. Сравнительная биодоступность генерической и оригинальной форм диклофенака с замедленным высвобождением // РМЖ. 2007. № 23. С. 1706.
23. Цветкова О.А. Эффективность и безопасность симvastатина и его дженериков // РМЖ. 2007. № 4. С. 282.
24. Чернявская Т.К. Основы оптимального выбора среди взаимозаменяемых лекарственных средств при лечении сердечно-сосудистых заболеваний // Системные гипертензии. 2012. № 1.
25. Шубик Ю.В. Амиодарон: между оригинальным препаратом и дженериком // РМЖ. 2009. № 4. С. 228.
26. Якушевич В.В. Оценка качества препаратов дженериков в кардиологии: реалии и возможности // Рац. фармакотер. в кардиологии. 2005. № 1. С. 13–8.
27. Birkett D.J. Generics — equal or not? // Austr. Prescr. 2003. № 26. P. 85–7.
28. Borgherini G. The bioequivalence and therapeutic efficacy of generic versus brand-name psychoactive drugs // Clin. Ther. 2003. № 25. P. 1578–92.
29. EMEA, The rules governing medicinal products in the European Union Investigation of Bioavailability and Bioequivalence. 1998. 3C. P. 231–244.
30. FDA, Electronic Orange Book. Approved Drug Products with Therapeutic Equivalence Evaluations, 23th Edition, 2003.
31. Frank R.G. The ongoing regulation of generic drugs // N. Engl. J. Med. 2007. № 357. P. 1993–6.
32. Genazzani A.A., Pattarino F. Difficulties in the production of identical drug products from a pharmaceutical technology viewpoint // Drugs R. D. 2008. № 9. P. 65–72.
33. Kanazawa T., Shimazake A., Sato T., Hoshino A.T. Synthesis of ursodeoxycholic acid and its conjugated bile acid // Proc. Jpn. Acad. 1954. № 30. P. 391–394.
34. Kesselheim A., Misono A. Lee J. et al. Clinical equivalence of generic and brand-name drugs used in cardiovascular disease. A systematic review and meta-analysis // JAMA. 2008. Vol. 300, № 21. P. 2514–2526.
35. Laroche M.L., Merle L. Generic and brand-name drugs. Are different criteria sufficiently taken into account before granting market authorisation? // Acta Clin. Belg. Suppl. 2006. № 1. P. 48–50.

УДК 616.36-003.826-008.6(045)

И.А. Морозов^{1*}, Л.Ю. Ильченко¹, И.Г. Федоров^{2,3},
И.В. Гордейчук¹, И.Н. Гордейчук⁴, А.К. Княженцева¹,
Е.А. Зверкова¹, М.И. Михайлов¹, Г.И. Сторожаков²

¹ ФГБУ Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова, отдел вирусных гепатитов, Москва

² ФБОУ ВПО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, кафедра госпитальной терапии № 2 лечебного факультета, Москва

³ МУЗ Городская клиническая больница № 12, отделение гастроэнтерологии и гепатологии, Москва

⁴ ГБОУ ВПО Тверская государственная медицинская академия, кафедра инфекционных болезней

СКРЫТЫЙ ГЕПАТИТ В: КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ И ПРОБЛЕМЫ ДИАГНОСТИКИ

Резюме

В обзоре представлены современные данные о распространенности, клинической значимости и методах диагностики скрытого гепатита В (СГВ). Рассмотрены причины возникновения скрытой формы хронического гепатита В (ХГВ) с отсутствием HBsAg и HBV DNA в сыворотке крови, среди которых важнейшей является коинфекция с другими гепатотропными вирусами. Показана диагностическая значимость определения антител к HBcAg. Приводится алгоритм выявления СГВ, предложенный авторами и состоящий из двух этапов: сывороточного и тканевого. Особое внимание уделено роли морфологических методов, включая гистохимию, иммуногистохимию и электронную микроскопию, в верификации HBV-инфекции и непосредственно вирионов в цитоплазме гепатоцитов.

Ключевые слова: хронический гепатит В, скрытый гепатит В, биопсия печени.

Abstract

In this report we present current data on prevalence, clinical significance and methods of diagnostics of occult hepatitis B. Mechanisms of occult hepatitis B formation are reviewed, among which the most important is co-infection with other hepatotropic viruses. Diagnostic significance of anti-HBcAg antibodies is shown. An algorithm of occult hepatitis B detection developed by the authors involves two stages: detection of viral markers in serum and liver tissue. Attention is drawn to the role of morphologic methods including histochemistry, immunohistochemistry and electron microscopy in verification of HBV-infection and direct visualization of virions in cytoplasm of hepatocytes.

Key words: chronic hepatitis B, occult hepatitis B, liver biopsy.

До недавнего времени считалось, что HBV-инфекция может протекать в одной из трех форм, а именно: острого гепатита В (ОГВ), характеризующегося симптомами острого поражения печени и интоксикации (с желтухой или без нее); ХГВ, характеризующегося длительным воспалительным поражением печени; персистирования поверхностного антигена HBV (HBsAg) в крови пациентов при отсутствии клинически выраженного гепатита.

Однако еще в 1978 г. был зарегистрирован случай развития ОГВ у реципиента после переливания крови, содержащей антитела к капсидному белку HBV (anti-HBc) в отсутствие HBsAg и антител к нему (anti-HBs). В дальнейшем было показано, что ДНК вируса может определяться в сыворотке крови и ткани печени пациентов, у которых доступными методами не выявлялся сывороточный HBsAg. Данное явление получило название скрытой (латентной) HBV-инфекции [14].

Следует отметить, что HBsAg по-прежнему является основным, а порой единственным сывороточным маркером HBV, определяемым в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами СП 3.1.1.2341–08, для исключения HBV-инфекции не только у доноров крови, но и у больных с подозрением на гепатит В. В силу этого скрытая HBV-инфекция является серьезной проблемой не только для гепатологов, но и для центров гемотрансфузии тех стран, в которых помимо отмытых форменных элементов крови для переливания реципиентам используют плазму или даже цельную кровь.

Несмотря на то что феномен СГВ был обнаружен почти четверть века назад, это явление, как и проблема вирусных гепатитов в целом, долго оставалась в тени другой инфекции, а именно вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), считавшегося болезнью века. Однако в настоящее время вирусные гепатиты по сложности решения проблемы вышли на первое место среди социально значимых инфекционных болезней.

* Контакты. E-mail: moroz38@gmail.com. Телефон: (498) 540-90-36

Понятие «скрытая HBV-инфекция»

В 2008 г. на конференции экспертов в Taormina, организованной Европейской ассоциацией изучения печени (EASL), понятие «скрытая HBV-инфекция» было определено как «присутствие HBV DNA в печени пациентов (вне зависимости от наличия HBV DNA в сыворотке крови), в сыворотке крови которых доступными методами не определяется HBsAg» [23]. Само определение скрытой HBV-инфекции свидетельствует о том, что диагностический поиск, ограниченный исследованием HBsAg, является неэффективным, а инфицированные лица пополняют группу пациентов с гепатитом неустановленной этиологии.

По мнению F.B. Hollinger и G. Sood [12], примерно в 20% сыворотки крови пациентов с наличием СГВ не определяются никакие серологические маркеры HBV-инфекции помимо HBV DNA. M. Torbenson, D.L. Thomas [24] установили, что 50% сывороток содержат антитела к капсидному белку HBV — HBcAg (в присутствии anti-HBs или без них); 35% сывороток содержат антитела к HBsAg (в присутствии anti-HBc или без них). Они считали, что на основании описанных данных СГВ можно подразделить на серопозитивный и серонегативный вариант, при котором в сыворотке крови пациентов не выявляются anti-HBc и anti-HBs. У пациентов с последним описанным вариантом уровень HBV DNA в сыворотке крови, как правило, минимален. Серопозитивные пациенты в дальнейшем могут быть разделены на две группы в зависимости от присутствия в сыворотке крови anti-HBs. Уровень HBV DNA наиболее высок у пациентов, позитивных по anti-HBc и негативных по anti-HBs. Такие пациенты с наибольшей вероятностью способны передавать инфекцию другим. У пациентов, позитивных как по anti-HBc, так и по anti-HBs, как правило, определяется средний уровень HBV DNA.

Наиболее часто СГВ регистрируется в первые дни после инфицирования HBV, в так называемом серологическом окне, когда в сыворотке крови пациентов еще не определяется HBsAg. Так или иначе, СГВ также может выявляться у пациентов, положительных по anti-HBc и имеющих ХГВ со снижением уровня HBsAg ниже уровня детекции, что нередко ассоциируется с появлением anti-HBs. Такая картина наблюдается в 0,7–4,3% случаев в год и ассоциируется с более старшим возрастом и наличием в сыворотке крови anti-HBe [17]. При этом следует учитывать, что вышеприведенные данные были получены более 10 лет назад, когда использовались существенно менее чувствительные методы детекции сывороточных антигенов и антител.

В последнее десятилетие применение новых высокочувствительных молекулярно-биологических методов привело к увеличению частоты выявления СГВ и

лучшему пониманию его вирусологических и клинических особенностей. Это состояние было описано у здоровых доноров крови, пациентов с хроническими заболеваниями печени (ХЗП) и пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой (ГЦК). Тем не менее, некоторые аспекты СГВ до сих пор не изучены, включая клиническую значимость СГВ в отношении риска передачи инфекции, ее реактивации и возможности прогрессирования ХЗП.

Патогенетические причины возникновения

Причины персистенции небольших количеств HBV DNA в отсутствие детектируемого уровня HBsAg до сих пор остаются неопределенными. Однако существует общее мнение о том, что в этом явлении важны факторы, связанные как с вирусом, так и с хозяином [11]. A. Zerbini и соавт. [26] исследовали специфический для HBV Т-клеточный ответ у пациентов с СГВ, в сыворотке крови которых присутствовали или отсутствовали anti-HBc IgG. У пациентов, позитивных по anti-HBc IgG, развивался типичный протективный иммунитет, что свидетельствует о возможном разрешении инфекции. Напротив, специфический Т-клеточный ответ на HBV не наблюдался у пациентов, негативных по anti-HBc IgG, что свидетельствует о невозможности формирования зрелого протективного иммунного ответа при низких уровнях репликации вируса. Эти результаты подтверждают различие механизмов контроля вирусной репликации у серопозитивных и серонегативных пациентов с СГВ.

Помимо влияния факторов, связанных с иммунным ответом хозяина, низкий уровень вирусной репликации может являться следствием присутствия дефектных вирусных частиц, а также мутаций в участках, отвечающих за контроль транскрипции, приводящих к неэффективности репликации [11]. Воздействие цитокинов на вирусную транскрипцию приводит к снижению уровня репликации и экспрессии HBsAg, а также недетектируемому уровню HBV DNA в сыворотке крови при ее наличии в ткани печени. Также было показано, что HBsAg принимает участие в регуляции высвобождения гепатоцитами новых вирионов и неинфекционных субвирусных частиц. Повышение уровня L-белка (большой белок HBsAg) ускоряет формирование вирусных частиц и их секрецию и ингибирует высвобождение неинфекционных субвирусных частиц. Напротив, низкий уровень L-белка приводит к обратному развитию ДНК-содержащих нуклеокапсидов и повышению числа выделяемых субвирусных частиц.

Отсутствие HBsAg в крови может быть вызвано не только упомянутым выше влиянием провоспали-

тельных цитокинов на вирусную транскрипцию, приводящих к снижению уровня репликации и экспрессии HBsAg и HBV DNA, но и рядом других причин, которые могут действовать одновременно: формированием иммунных комплексов между HBsAg и anti-HBs, неопределяемых современными методами [13]; появлением мутаций в «а»-детерминанте S-гена, приводящих к аминокислотным заменам в главной гидрофильной петле HBsAg и невозможности обнаружения HBsAg с помощью используемых на настоящий момент методов его детекции, а также коинфекцией вирусами гепатита D, HCV, HIV, приводящей к снижению уровня синтеза HBsAg и репликации HBV [25].

По нашему мнению, последняя причина может быть наиболее значимой, поскольку частота встречаемости хронических вирусных гепатитов с коинфекцией различными гепатотропными вирусами в последнее время существенно возросла. Известно, что коинфекция HBV у пациентов с ХГС может в значительной мере сказываться на течении заболевания, уровне вирусной нагрузки, а также эффективности лечения. У пациентов, инфицированных одновременно HBV и HCV, по сравнению с моноинфекцией HBV, HBsAg появляется позже и детектируется в сыворотке крови в течение меньшего времени, концентрация HBV DNA ниже, как и уровень аланинаминотрансферазы (АЛТ) [49]. Ранее было показано, что core-белок HCV ингибирует репликацию HBV и экспрессию его генов [21]. Однако это наблюдение недавно было поставлено под сомнение. P. Bellecave и соавт. [4] показали возможность репликации обоих вирусов *in vitro* на линии клеток HUN7. Можно предположить, что влияние коинфекции на репликацию HBV связано с действием таких не прямых механизмов, как врожденный и приобретенный иммунитет хозяина [8, 19]. Таким образом, отсутствие достоверной информации об особенностях течения ХГС при коинфекции HBV, протекающей в скрытой форме, не позволяет разработать рекомендации диагностики и ведения таких пациентов. Не исключено, что коинфекция другими, даже не гепатотропными вирусами, также может отражаться не только на клинических проявлениях заболевания, но и патогенетических механизмах развития патологии.

Распространенность скрытой HBV-инфекции

По данным различных публикаций, распространенность скрытой HBV-инфекции варьирует в разных исследуемых группах [1, 11]. Ее встречаемость составляет от 0% до 2,4% среди HBsAg-негативных, anti-HBc-позитивных (но anti-HBs +/-) доноров крови в западных странах (как,

например, в США, где лишь 5% населения в течение жизни встречались с HBV), до 6% — в схожих группах доноров, проживающих на эндемичных территориях, где с HBV встречались 70–90% населения [6]. Однако большинством исследователей по всему миру было отмечено, что скрытая (латентная) HBV-инфекция встречается в среднем у 20% больных ХГВ и зависит от эндемичности региона [11]. Ранее в 1999 г. I. Cacciola и соавт. [5] было проведено сравнение распространенности скрытой HBV-инфекции среди пациентов с ХГС. С этой целью обследовано 200 HBsAg-негативных пациентов с HCV-инфекцией, при этом у 100 в сыворотке крови обнаруживались anti-HBc, у остальных отсутствовали какие-либо серологические маркеры HBV-инфекции. Однако HBV DNA в сыворотке крови была обнаружена не только у 46 пациентов с anti-HBc (46%), но и у 20 больных без anti-HBc (20%).

В недавнем исследовании, проведенном в Италии, СГВ был обнаружен у 16,3% из 98 пациентов без каких-либо клинических или биохимических признаков заболевания печени [22]. Большинство пациентов с СГВ имело anti-HBc (62,5%). В другом исследовании, проведенном в Японии Н. Matsuda и соавт. [16], было дано свидетельство присутствия СГВ у 13 из 14 здоровых доноров печени, серопозитивных по anti-HBc и anti-HBs; в то же время ДНК ВГВ не определялась ни у одного пациента с «изолированными» anti-HBs.

До сих пор неясно, являются ли пациенты с СГВ потенциальным источником HBV-инфекции, изменяется ли у них течение других заболеваний и повышен ли у них риск развития осложнений, ассоциирующихся с ХГВ. Моделирование гепатита В на североамериканских сурках (woodchuck hepatitis B — WHV) показало возможность передачи вируса от матери к плоду, что может свидетельствовать о возможности вертикальной трансмиссии у людей [9, 10, 18]. Годовальные сурки, перенесшие инфекцию WHV и выработавшие «протективные» антитела, имели небольшое количество вируса в клетках печени и мононуклеарах периферической крови. У животных также наблюдалось воспаление в ткани печени, в итоге приведшее к развитию ГЦК.

Противоречивые данные имеются относительно клинической значимости наличия небольших количеств ДНК HBV в организме иммунокомпетентных пациентов, перенесших ОГВ, и лиц без клинических или биохимических проявлений заболевания печени. В основном считается, что пациенты, перенесшие ОГВ, не имеют клинических признаков заболевания печени помимо небольших количеств HBV DNA в сыворотке, мононуклеарах периферической крови и/или ткани печени, которые могут определяться спустя десятилетия [22].

ДИАГНОСТИКА И ЕЕ АЛГОРИТМ

Проведенный обзор основных публикаций по проблеме СГВ за последнее десятилетие подтверждает противоречивость сведений о распространенности, клинической значимости и методах диагностики данной формы хронического гепатита. Особенно это касается диагностической значимости anti-HBc. Их появление в крови происходит очень быстро после инфицирования HBV и чаще всего предшествует HBsAg. Считается, что anti-HBc можно найти у каждого, кто имел контакт с HBV, и что они присутствуют в разные фазы заболевания даже после элиминации вируса. Именно поэтому группа экспертов EASL, собиравшаяся в Taormina [23], посчитала anti-HBc неидеальным маркером HBV-инфекции, но все-таки рекомендовала его использование в качестве сурrogатного, когда тест на HBV DNA недоступен для выявления серопозитивных лиц с СГВ, например, в случае донорства крови и органов, а также у пациентов, подвергающихся иммуносупрессивной терапии.

По мнению F.B. Hollinger, G. Sood, [12], лучшим способом диагностики СГВ является определение HBV DNA в ткани печени. Однако они считают, что проведение биопсии печени не всегда возможно, а методы детекции HBV DNA в ткани печени не стандартизованы. A. Madejon и соавт. показали [15], что длительность промежутка времени между получением биоптата и его замораживанием является критическим фактором для сохранения нуклеиновых кислот и их последующей детекции. Этот период времени не должен превышать 3 мин. Вместе с тем, в большинстве случаев СГВ проведение биопсии оправдано, поскольку, помимо возможности определения HBV DNA в ткани печени, предоставляется возможность ее морфологического исследования с проведением специального (иммуноморфологического и электронно-микроскопического) изучения и установления этиологии заболевания. Однако с момента обнаружения феномена скрытого течения ХГВ морфологические исследования не проводились, о чем свидетельствуют все цитированные нами публикации.

Учитывая эти недостатки в решении проблемы СГВ, нами на основании предложений экспертов EASL разработан алгоритм, состоящий из двух этапов исследования: серологического и тканевого [2, 3], который был использован в наших исследованиях.

Первый этап начинался с определения HBsAg в сыворотке крови и в дальнейшем касался проведения иммуноферментного анализа (ИФА) и полимеразной цепной реакции (ПЦР) всех образцов сывороток HBsAg-негативных пациентов с ХЗП.

I. Серологические этапы выявления скрытой HBV-инфекции

1. Первичное определение HBsAg (ИФА) (чувствительность 0,01 нг/мл)
HBsAg (+) → HBV-инфекция
HBsAg (–) → отсутствие HBV ↓

2. Определение anti-HBc
anti-HBc (–) → отсутствие HBV
anti-HBc (+) → предварительный диагноз «HBV-инфекция»

3. Исследование на HBV DNA в сыворотке крови (ПЦР, чувствительность 150 и менее копий/мл)
HBV DNA (+) → диагноз HBV-инфекция
HBV DNA (–) → ? а) перенесенный ГВ
б) ложноположительный результат anti-HBc

II. Тканевые этапы выявления скрытой HBV-инфекции

Обязательная биопсия печени и проведение патогистологического исследования активности и стадии заболевания.

Специальные методы исследования ткани печени проводят в зависимости от возможностей и оснащенности лечебного учреждения:

- Гистологическая окраска орсеином на HBsAg по Shikata.
- Иммуногистохимическое (ИГХ) выявление HBsAg.
- ПЦР для определения HBV DNA в ткани печени.
- Электронномикроскопическое (ЭМ) изучение биоптата печени для выявления вирионов, их видовой принадлежности к HBV (иммуноцитохимия (ИЦХ) HBsAg) и специфических для HBV-инфекции изменений.

Положительный результат любого из специальных методов служит основанием для окончательного диагноза «HBV-инфекция», если инфекционность вирионов доказана, либо «скрытая форма HBV».

В работе были использованы самые чувствительные иммунобиологические методы верификации HBV-инфекции. В сыворотке крови HBsAg определяли тест-системой с чувствительностью 0,01 нг HBsAg на 1 мл исследуемого образца («ДС ИФА HBsAg 0,01» производства НПО «Диагностические системы», г. Нижний Новгород). Anti-HBc определяли тест-системой «ДС АНТИ-HBc» того же производителя. Детекция HBV DNA в сыворотках крови и биоптатах печени проводилась методом двухступенчатой ПЦР с праймерами, перекрывающими Core, S и P регионы молекулы ДНК этого вируса.

Биопсийный материал с соответствующей подготовкой был использован для проведения патогистологического, ИЦХ, ЭМ-исследования.

Среди обследованных 168 пациентов с ХЗП anti-HBc были обнаружены у 60 (35,7%). Из числа этих 60 больных были исключены лица с установленным диагнозом гепатита В (HBsAg+) и отобраны 35 пациентов, у которых в сыворотке крови отсутствовали HBsAg и HBV DNA, с диагнозами: ХГС (n = 12), хронический алкогольный гепатит (n = 9), неалкогольный стеатогепатит (n = 4), смешанный гепатит (неалкогольный гепатит у пациентов с хронической алкогольной интоксикацией, n = 2) и хронический гепатит неустановленной этиологии (n = 6). У одного больного было подозрение на СГВ и у одного диагностирована моноинфекция ТТV. У большинства больных исследуемой группы клинический диагноз предполагал наличие внутриклеточной липидной инфильтрации в ткани печени. Однако лишь у 4 из 35 пациентов была обнаружена умеренная крупнокапельная инфильтрация триглицеридами, а у 4 — слабовыраженная мелкокапельная ее форма, т.е. у большинства обследованных больных отсутствовал один из основных патогномоничных признаков алкогольного или неалкогольного стеатогепатита, а клинический диагноз, по-видимому, ставился на основании УЗИ, а также анамнестических сведений.

С целью выявления скрытой HBV-инфекции было проведено ИГХ биопсийного материала с положительным и отрицательным контролем. При ИГХ с моноклональными антителами к HBsAg и HBcAg во всех биопсиях обнаружена положительная реакция на HBsAg. Вместе с тем, реакция на HBcAg в большинстве случаев у пациентов с моноинфекцией HBV была слабовыраженной, что свидетельствовало о низкой репликативной активности и хроническом, неактивном течении заболевания (рис. 1а, б).

При ЭМ-изучении биопсийного материала у всех больных установлено наличие вирионов HBV в цитоплазме гепатоцитов (рис. 2а). Вирусные частицы представляют собой сферические образования умеренной электронной плотности, с фестончатыми краями и слабовыраженным гликокаликсом.

Средний диаметр вирионов составил $49,281 \pm 2,637$ нм, что несколько больше, чем при негативном контрастировании (42 нм) уранилацетатом или фосфорно-вольфрамовой кислотой, которые перекрывают фестончатый край и гликокаликс вирионов.

Вид вирионов в цитоплазме гепатоцитов напоминает «эффект рассыпанного гороха», причем вирионы между собой не соприкасаются. Принадлежность этих вирионов к HBV подтверждается ЭМ-иммуноцитохимией с моноклональными антителами к HBsAg и использованием комплекса Protein A — Colloidal Gold для визуализации реакции антиген-антитело (рис. 2б).

Сам факт наличия вирионов не только подтверждает результаты иммуноцитохимической верификации

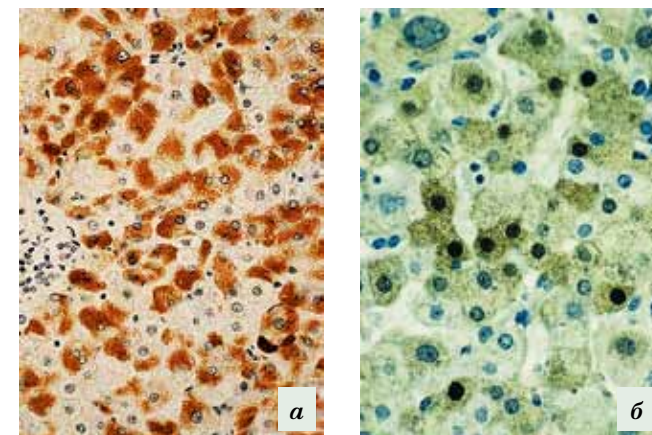


Рисунок 1. ИГХ печени больного при хронической моноинфекции HBV.

а) HBsAg в гепатоцитах, в фазе накопления, x 200. б) Неподходящее количество HBcAg при ГВ минимальной активности и слабой репликации вируса, x 400

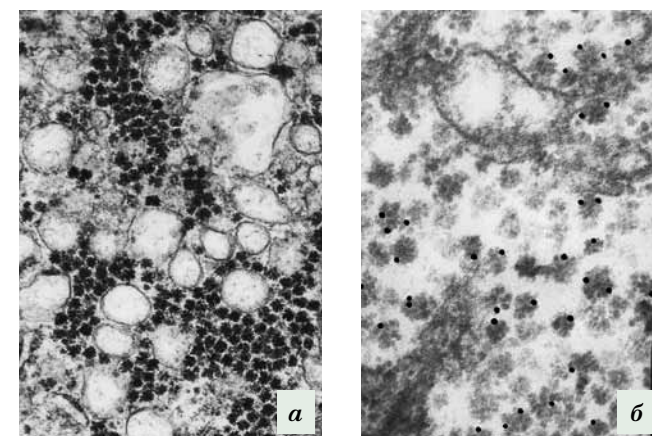


Рисунок 2. а) Множественные HBV-вирионы в цитоплазме гепатоцита больной СГВ, x 20 000. б) Продукт ИГХ-реакции с моноклональными антителами к HBsAg и комплексом Protein A – Colloidal Gold 15 нм на вирионах. Препарат не контрастирован, x 50 000

скрытой HBV-инфекции, но и доказывает вирусную природу заболеваний, а также опровергает первоначальный клинический диагноз. В фазу накопления цитоплазма большинства гепатоцитов плотно заполнена HBV-вирионами. Отмечается активация лизосомального аппарата и активный фагоцитоз вирусов. В результате образуется большое количество резидуальных тел, содержащих липофусцин и миелоноподобные ламеллы. В цитоплазме и в матриксе митохондрий часто наблюдаются паракристаллические белковые образования. Большинство митохондрий имеют дезэнергизованный вид с небольшим количеством крист и матриксом средней плотности. Однако среди них встречаются очень крупные, вытянутые в длину органеллы с необычно большим количеством продольно расположенных

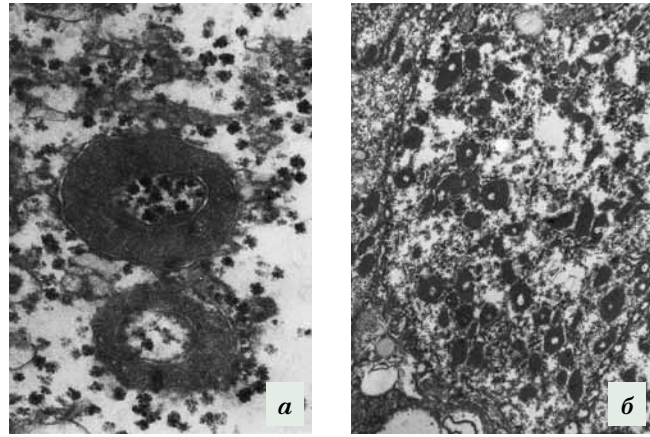


Рисунок 3. Специфические для ХГВ торообразные митохондрии.

а) Тонкая структура митохондрий (объяснения в тексте). $\times 30\,000$. б) Множественные торообразные митохондрии в цитоплазме гепатоцита с HBV-вирионами и их отсутствие в гепатоците с HCV-вирионами при микст-инфекции HBV и HCV. М – митохондрии. $\times 6\,000$

крист и просветленным матриксом. Столь необычная гипертрофия внутренней мембраны без соответствующего усиления функции может быть результатом мутации митохондриальной ДНК (вследствие экспансии нуклеотидов вирусной ДНК) и синтезом измененных структурных белков. Вышеперечисленные изменения неспецифичны, поскольку встречаются и при других вирусных гепатитах. Вместе с тем при моноинфекции HBV нами были обнаружены кольцевидные (торообразные) митохондрии с матриксом умеренной плотности (рис. 3а, б) и большой протяженностью внутренней мембраны, которые не наблюдались при других гепатитах вирусной природы. Подобные изменения митохондрий, наряду с наличием HBV-вирионов, являются, на наш взгляд, единственными специфическими признаками хронического течения вирусного гепатита.

Изменения биохимических показателей ферментов воспаления у обследованных пациентов варьировали в столь широких пределах, что проведение оценки дополнительных маркеров перенесенной HBV-инфекции на течение ХЗП не представлялось возможным. Тем не менее, следует отметить, что уровень аланиновой и аспарагиновой аминотрансфераз (АЛТ, АСТ) при коинфекции HBV с HCV был существенно выше, чем при моноинфекции HBV. При коинфекции уровень АЛТ варьировал в диапазоне $39\text{--}406$ МЕ/л (средний — $120,85 \pm 26,7$ МЕ/л), а АСТ — $25\text{--}139$ МЕ/л (средний — $88,4 \pm 12,8$ МЕ/л), тогда как при моноинфекции HBV уровень АЛТ в среднем составил $49,6 \pm 6,3$ МЕ/л, а АСТ — $57,1 \pm 7,5$ МЕ/л.

Изученные нами случаи скрытой HBV-моноинфекции характеризовались минимальными клинико-

биохимическими и морфологическими изменениями, а также низким уровнем виремии и отсутствием в структуре HBsAg аминокислотных замен, способных повлиять на эффективность его детекции в ИФА. Присутствие только стабильно выявляемых anti-HBc IgG обычно рассматривается как свидетельство перенесенной инфекции с элиминацией вируса и ремиссией заболевания. У всех пациентов с anti-HBc было установлено наличие HBV в ткани печени, включая и всех больных ХГС. В наших исследованиях повторно определялись anti-HBc с целью исключения ложноположительных результатов. На этом основании можно утверждать, что присутствие anti-HBc в сыворотке крови свидетельствует не о перенесенной HBV-инфекции, а о наличии HBV-вирионов в ткани печени, и что anti-HBc может служить эффективным, хотя и «суррогатным», по мнению экспертов, маркером HBV-инфекции.

Отсутствие детектируемого уровня HBV DNA в сыворотке крови не является фактом, исключающим наличие скрытой инфекции. Даже в таких случаях вирус может находиться в ткани печени. В основе этого явления лежит сам механизм репликации этого вируса: в ядре инфицированного гепатоцита может содержаться достаточное количество копий кольцевой ковалентно замкнутой ДНК — стабильной матрицы для транскрипции вирусных белков и репликации вирионов [14].

По нашему мнению, коинфекция HBV с различными гепатотропными и негепатотропными вирусами может являться наиболее значимой причиной появления скрытых форм хронического гепатита, поскольку частота хронических микст-гепатитов, вызванных несколькими гепатотропными вирусами, в последнее время существенно возросла. Даже в проведенных нами исследованиях все больные с ХГС, а также больной с гепатитом, вызванным TTV, были коинфицированы HBV.

К наиболее частым коинфектам следует отнести *Anelloviruses*, распространенность которых приближается к 100% не только у человека, но и у большинства млекопитающих [20]. Они проявляют свойства как парентерально передаваемых вирусов, так и энтеральных, и могут передаваться всеми способами, за исключением аэрозольно-капельного. Поскольку вирусы этой группы имеют многочисленные генотипы, каждый из которых имеет тропизм к определенным тканям и органам, в организме человека могут сосуществовать несколько генотипов TTV и TT-like mini virus (TTMV), и не все из них имеют отношение к патологии печени.

TTMV обнаруживался в среднем у 8 из 10 больных с ХЗП в лимфоцитах, нейтрофилах и тромбоцитах крови синусоидов печени, т.е. был лимфотропен. Однако в последнее время нам удалось у 6 больных с ХГВ (у 2/6 — с СГВ) выявить множество вирионов

TTMV, расположенных в ядрах гепатоцитов, что доказывает их гепатотропность.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, наше исследование показало, что включение в обследование пациентов определения anti-HBc в сыворотке крови меняет представление об этиологии ХЗП. Было установлено, что встречаемость скрытой формы ГВ среди пациентов с ХЗП в гастроэнтерологическом отделении чрезвычайно высока и составляет не менее 20%. Полученные результаты согласуются с литературными данными. Так, в недавно проведенном исследовании I. Castillo и соавт. [7] определяли HBV DNA и HCV RNA в ткани печени у 76 HBsAg-негативных пациентов со стабильным повышением уровня активности АЛТ, наблюдавшихся в течение 2 лет. В указанной группе у 22% пациентов была выявлена скрытая HBV-инфекция, у 46% — HCV-инфекция, у 32% — скрытая коинфекция обоими вирусами (т.е. у 54% пациентов в ткани печени обнаруживали HBV DNA и HCV RNA).

На основании полученных результатов можно заключить, что скрытый гепатит — одна из форм хронической HBV-инфекции, трудность диагностики которой во многом преувеличена и обусловлена, прежде всего, недостатками диагностических стандартов, а также методическим оснащением муниципальных лечебных учреждений. Одно только введение в стандарты диагностики определения антител к HBsAg позволит достаточно надежно выявить наличие HBV-инфекции у больного.

А

Список литературы

1. Вирусные гепатиты в Российской Федерации 2009. Аналитический обзор / Под ред. Г.Г. Онищенко, А.Б. Жебруна. СПб.: НИЭМ им. Пастера, 2009. С. 17–41.
2. Гордейчук И.В. Выявление и клинико-морфологическая характеристика скрытой ВГВ-инфекции среди HBsAg-негативных пациентов с хроническими заболеваниями печени // ДЖИП. 2010. № 17. С. 42–49.
3. Морозов И.А., Ильченко Л.Ю., Кюреган К.К. и др. Латентная HBV-инфекция и алгоритм ее выявления у пациентов с хроническими заболеваниями печени // В мире вирусных гепатитов. 2011. № 1. С. 19–26.
4. Bellecave P., Gouttenoire J., Gajer M. et al. Hepatitis B and C virus coinfection: a novel model system reveals the absence of direct viral interference // Hepatol. 2009. Vol. 50. P. 46–55.
5. Cacciola I., Pollicino T., Squadrito G. et al. Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis C liver disease // NEJM. 1999. Vol. 341. P. 22–26.
6. Carman W.F. The clinical significance of surface antigen variants of hepatitis B virus // J. Viral. Hepat. 1997. Vol. 4. P. 11–20.
7. Castillo I., Rodriguez-Illcigo E., Lypez-Alcorocho J. et al. Comparative study on the clinical and virological characteristics among patients with single occult hepatitis B virus (HBV), single occult hepatitis C virus (HCV) and occult HBV and HCV dual infection // J. Med. Virol. 2007. Vol. 3. P. 236–241.
8. Chu C.J., Lee S.D. Hepatitis B virus/hepatitis C virus coinfection: epidemiology, clinical features, viral interactions and treatment // J. Gastroenterol. Hepatol. 2008. Vol. 23. P. 512–520.
9. Coffin C.S., Michalak T.I. Persistence of infectious hepadnavirus in the offspring of woodchuck mothers recovered from viral hepatitis // J. Clin. Invest. 1999. Vol. 104. P. 203–212.
10. Coffin C.S., Pham T.N.Q., Mulrooney P.M. et al. Persistence of isolated antibodies to woodchuck hepatitis virus core antigen is indicative of occult infection // Hepatol. 2004. Vol. 40. P. 1053–1061.
11. Hollinger F.B. Hepatitis B virus infection and transfusion medicine: science and the occult // Transfusion. 2008. Vol. 48. P. 1001–1026.
12. Hollinger F.B., Sood G. Occult hepatitis B virus infection: a covert operation // J. Viral Hepat. 2010. Vol. 17. P. 1–15.
13. Hu K.Q. Occult hepatitis B virus infection and its clinical implications // J. Viral Hepat. 2002. Vol. 9. P. 243–257.
14. Jeantet D., Chemin I., Mandrand B. et al. Cloning and expression of surface antigens from occult chronic hepatitis B virus infections and their recognition by commercial detection assays // J. Med. Virol. 2004. Vol. 73. P. 508–515.
15. Madejon A., Manzano M.L., Arocena C. et al. Effects of delayed freezing of liver biopsies on the detection of hepatitis C virus RNA strands // J. Hepatol. 2000. Vol. 32. P. 1019–1025.
16. Marusawa H., Uemoto S., Hijikata M. et al. Latent hepatitis B virus infection in healthy individuals with antibodies to hepatitis B core antigen // Hepatol. 2000. Vol. 31. P. 488–495.
17. McMahon B.J., Holck P., Bulkow L., Snowball M. Serologic and clinical outcomes of 1536 Alaska natives chronically infected with hepatitis B virus // Ann. Intern. Med. 2001. Vol. 135. P. 759–768.
18. Michalak T.I., Pasquinelli C., Guilhot S., Chisari F.V. Hepatitis B virus persistence after recovery from acute viral hepatitis // J. Clin. Invest. 1994. Vol. 93. P. 230–239.
19. Mimms L.T., Mosley J.W., Hollinger F.B. et al. Effect of concurrent acute infection with hepatitis C virus on acute hepatitis B virus infection // BMJ. 1993. Vol. 307. P. 1095–1097.
20. Ninomiya M., Takahashi M., Nishizawa T. et al. Development of PCR assays with nested primers specific for differential detection of the three human anelloviruses and early acquisition of dual or triple infection during infancy // J. Clin. Microbiol. 2008. Vol. 46. P. 507–514.
21. Pasquinelli C., Shoenberger J.M., Chung J. et al. Hepatitis C virus core and E2 protein expression in transgenic mice // Hepatol. 1997. Vol. 25. P. 719–727.
22. Raimondo G., Navarra G., Mondello S. et al. Occult hepatitis B virus in liver tissue of individuals without hepatic disease // J. Hepatol. 2008. Vol. 48. P. 743–746.
23. Raimondo G., Allain J.P., Brunetto M.R. Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection // J. Hepatol. 2008. Vol. 49. P. 652–657.
24. Torbenson M., Thomas D.L. Occult hepatitis B // Lancet Infect. Dis. 2002. Vol. 2. P. 479–486.
25. Weinberger K.M., Bauer T., Bohm S., Jilg W.G. High genetic variability of the group-specific a-determinant of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) and the corresponding fragment of the viral polymerase in chronic virus carriers lacking detectable HBsAg in serum // J. Gen. Virol. 2000. Vol. 81. P. 1165–1174.
26. Zerbini A., Pilli M., Boni C. et al. The characteristics of the cell-mediated immune response identify different profiles of occult hepatitis B virus infection // Gastroenterol. 2008. Vol. 134. P. 1470–1481.