

ОРИГІНАЛЬНИЙ СПОСІБ ВПЛИВУ НА РІВЕНЬ АКТИВНОСТІ ПРОЗАПАЛЬНОГО ЦИТОКІНУ ФАКТОРА НЕКРОЗУ ПУХЛИН – АЛЬФА

Б.А. Герасун¹, О.М. Зінчук¹, О.А. Голубовська², Р.Ю. Грицко¹,
О.Б. Герасун¹, А.М. Задорожний¹

¹Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького, м. Львів, Україна

²Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця, м. Київ, Україна

У статті розглядається новий персоніфікований метод впливу на стан активності прозапального цитокіну – фактора некрозу пухлин альфа шляхом внутрішньошкірної імунізації аутолейкоцитами. Встановлено, що імунізація аутолейкоцитами призводить до значного зменшення високого рівня синтезу фактора некрозу пухлин альфа, що позитивно впливає на перебіг таких захворювань як псоріаз та хронічний гепатит В. В окремих хворих на псоріаз та вірусний гепатит, в яких фактор некрозу не вдавалося виявити методом ІФА, після імунізації аутолейкоцитами його вміст у крові збільшувався, що також позитивно впливало на перебіг цих захворювань.

Ключові слова: фактор некрозу пухлин-альфа, імунізація аутолейкоцитами, хронічний гепатит В, псоріаз.

ОРИГИНАЛЬНЫЙ СПОСОБ ВЛИЯНИЯ НА УРОВЕНЬ АКТИВНОСТИ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ЦИТОКИНА ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ – АЛЬФА

Б.А. Герасун¹, А.Н. Зинчук¹, О.А. Голубовская², Р.Ю. Грицко¹,
А.Б. Герасун¹, А.М. Задорожний¹

¹Львовский национальный медицинский университет им. Данила Галицкого, г. Львов, Украина

²Национальный медицинский университет им. А.А. Богомольца, г. Киев, Украина

В статье рассматривается новый персонифицированный метод влияния на уровень активности провоспалительного цитокина – фактора некроза опухолей альфа путем внутрикожной иммунизации аутолейкоцитами. Установлено, что иммунизация аутолейкоцитами способствует значительному снижению высокого уровня синтеза фактора некроза опухолей альфа, что положительно влияет на такие болезни как псоріаз и хронический гепатит В. У некоторых

больных, из числа тех, у кого фактор некроза не удавалось выявить методом ИФА, после иммунизации аутолейкоцитами его содержание в крови увеличилось, что также положительно влияло на течение болезни.

Ключевые слова: фактор некроза опухолей-альфа, иммунизация аутолейкоцитами, хронический гепатит В, псориаз.

ORIGINAL METHOD OF INFLUENCE ON THE LEVEL OF PRO-INFLAMMATORY CYTOKINE TNF-ALPHA ACTIVITY

B.A. Herasun¹, O.M. Zinchuk¹, O.A. Holubovska², R.Y. Hrytsko¹, O.B. Herasun¹,
A.M. Zadorozhnyi¹

¹Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

²National Medical University named after O.O. Bohomolets, Kyiv, Ukraine

A new personified method of influence on activity condition of pro-inflammatory cytokine – tumor necrosis factor alpha by means of intradermal autoleukocyte immunization has been described in the article. It has been established that autoleukocyte immunization leads to a significant decrease in a high level of tumor necrosis factor synthesis, which has a positive impact on the course of such diseases as psoriasis and chronic hepatitis B. In some patients with psoriasis and viral hepatitis, if necrosis factor could not be detected by ELISA method, its amount in the blood increased after immunization, which also had a positive impact on the course of these diseases.

Key words: tumor necrosis factor alpha, autoleukocyte immunization, chronic hepatitis B, psoriasis.

Вступ. Фактор некрозу пухлин-альфа (ФНП-альфа) розглядається як мультифункціональний прозапальний цитокін, що приймає участь у імунних та запальних процесах. Встановлено, що різноманітність проявів ФНП-альфа залежить від інтенсивності його синтезу. У низьких концентраціях він посилює продукцію адгезивних молекул на клітинах ендотелію, активує кілінгову потенцію фагоцитуючих антитіл та синтез лімфокінів хелперними Т-лімфоцитами, посилює ріст В-клітин. Натомість у

великій концентрації ФНП-альфа може виступати як медіатор, що призводить до розвитку ендотоксин-індукованого септичного шоку; здатний пригнічувати ліпопротеїнову ліпазу жирової тканини, сприяючи розвитку кахексії; посилює продукцію простагландинів, що реалізує його токсичні ефекти [1]. Його провідна роль у розвитку інтенсивного запального процесу здійснюється шляхом стимуляції багатьох прозапальних цитокінів, зокрема IL1, IL2, IL6, IL8 [2-3].

ФНП у великій концентрації не тільки сприяє розвитку кахексії та є чинником некрозу пухлин, він може відігравати негативну роль при багатьох патологічних станах [1-10]. Висока активність ФНП-альфа характерна для хворих із хронічною серцевою недостатністю різної етіології [2, 11, 12], ревматоїдним артритом [13], псоріазом [14, 15].

Вважається, що ФНП шляхом хемотоксичного та активуючого впливу на моноцити та нейтрофіли, посилює цитотоксичність макрофагів та індукуює продукцію протеаз і цитокінів, що призводить до патологічних процесів, які служать основою багатьох різних захворювань. Особливо це стосується органів гепатобіліарної системи. ФНП належить до універсальних факторів ушкодження печінки [16]. Дисбаланс регуляції апоптозу може призводити до фіброзу або некрозу гепатоцитів [17, 18].

Сучасна стратегія лікування ряду запальних процесів передбачає цитокінову та антицитокінову терапію. У першу чергу це стосується пригнічення синтезу прозапальних цитокінів. Після розробки технології створення химерних моноклональних антитіл їх почали використовувати для зменшення активності цитокінів, особливо ФНП-альфа.

Роль ФНП-альфа у патогенезі таких захворювань як ревматоїдний артрит та псоріаз підтверджується ефективністю медикаментозних методів інгібіції прозапального цитокіну. Подібні результати спостерігаються і при інших хворобах. Те, що ФНП-альфа виконує головну роль

у розвитку запальних процесів, підтверджує висока клінічна ефективність препаратів, які є блокаторами цього цитокіну або гальмують проліферацію Th1-лімфоцитів, виробляючих цей цитокін. Проте, більшість цих препаратів містять гетерогенні білки до ФНП-альфа або їх рецепторів, а це може призводити до алергічних реакцій. До того ж пригнічення синтезу цитокінів за допомогою антитіл до певних детермінант імункомпетентних клітин негативно впливає на стан імунної системи. Тривале їх призначення може сприяти розвитку інфекційних захворювань (призводити до ускладнень терапії). Зрозуміло, що такі методи впливу на ФНП-альфа протипоказані для хворих з хронічними вірусними гепатитами та іншими інфекційними хворобами. Для нормалізації вмісту ФНП-альфа у хворих з хронічними запальними процесами у гепатобіліарній зоні використовують деякі гепатопротектори, зокрема, тіатриазолін [16], однак їх ефективність є недостатньою. Саме тому метою нашого дослідження було створення нового ефективного методу зменшення синтезу прозапального цитокіну ФНП-альфа без негативного впливу на стан імунної системи.

У наших попередніх дослідженнях з лікування автоімунних процесів, зокрема системних васкулітів, була встановлена ефективність внутрішньоживоткової імунізації автолейкоцитами, яку ми розглядаємо як персоналізований метод клітинної терапії. Позитивний вплив на клініку системних васкулітів та інших автоімунних

станів [19-24] теоретично співпадає із впливом на активність прозапальних цитокінів. Саме це і стало підставою для випробування внутрішньошкірної імунізації автолейкоцитами як способу впливу на вміст ФНП-альфа у сироватці крові.

Метою нашого дослідження було вивчення можливості впливу на активність ФНП-альфа шляхом використання власних біофакторів організму з широким діапазоном біологічного впливу.

Матеріали та методи дослідження.

Для вивчення впливу внутрішньошкірної імунізації автолейкоцитами на синтез ФНП-альфа були вибрані групи хворих на псоріаз (24) та хворих на ХГВ (17) із високим вмістом цього цитокіну (≥ 30 пг/мл). Хворих із псоріазом вибирали випадково, без врахування особливостей клінічного перебігу, єдиною умовою було підвищення вмісту ФНП-альфа у сироватці крові. Група хворих складалася з пацієнтів із псоріазом, віком від 18 до 58 років (жінок – 11, чоловіків – 13). На обліку у дерматологів з приводу псоріазу пацієнти стояли від 3 до 15 років. До групи хворих на ХГВ увійшли 17 пацієнтів віком від 20 до 60 років (жінок – 10, чоловіків – 7). При ХГВ обов'язковою умовою була моноінфекція (виключали гепатит С, ВІЛ-інфекцію).

Паралельно обстежували також хворих на псоріаз (9) та ХГВ (12), у яких методом ІФА не вдавалось виявити ФНП-альфа.

У дослідження увійшли пацієнти, які не приймали медикаментоз-

ні препарати, що впливають на вміст цитокінів.

ФНП-альфа у сироватці крові визначали методом, який базується на «сандвіч» варіанті твердофазного імуноферментного аналізу з використанням моно- та антиклональних антитіл до ФНП-альфа (виробник «Вектор Бест», Росія).

Досліджуваний спосіб зменшення активності прозапального цитокіну передбачає два етапи: виділення лейкоцитів з периферійної крові та внутрішньошкірне введення їх пацієнту. Методика імунізації та механізм її дії описані раніше [19-24].

Через 10-12 днів, 30, 60 та 180 днів після імунізації досліджували вміст ФНП-альфа у сироватці крові. У подальшому спостерігали за вмістом цитокіну, при потребі імунізацію повторювали (індивідуально, з врахуванням особливостей відповіді на процедуру).

Результати дослідження та їх обговорення.

Про вплив імунізації автолейкоцитами на інтенсивний синтез ФНП-альфа у сироватці крові свідчать результати спостереження за його вмістом до і після імунізації (табл. 1).

З наведених у табл. 1 даних видно, що зменшення вмісту ФНП-альфа відбулось у всіх проімунізованих хворих (100%). У більшості з них (16 з 24; 66,67%) вміст ФНП-альфа після імунізації став коливатися в межах 0-5 пк/мл. Проте у частини хворих, попри значне зменшення, вміст ФНП-альфа все ж залишався високим. Так, із 13 хворих із початковим

Вплив імунізації автолейкоцитами на високий вміст ФНП-альфа (понад 30 пг/мл) у сироватці крові хворих на псоріаз (по результатах обстеження через 30 днів після одноразової імунізації автолейкоцитами)*

Вміст ФНП-альфа до імунізації автолейкоцитами (пг/мл)	Кількість хворих	Вміст ФНП-альфа через 30 днів після імунізації автолейкоцитами (пг/мл)			
		0-5	30-50	51-60	61-100
		Кількість хворих			
30-50	3	3			
51-100	2	2			
150-200	6	4	1	1	
201-250	5	3	2		
> 250	8	4	1	1	2
Разом	24	16 (66,7%)	4 (16,7%)	2 (8,3%)	2 (8,3%)

* Зменшення вмісту ФНП-альфа зареєстровано вже через 10 днів після імунізації автолейкоцитами. В окремих хворих вплив імунізації посилювався протягом місяця. Саме тому в таблиці наведені результати, отримані через 30 днів після лікувальної процедури.

вмістом ФНП-альфа понад 200 пг/мл у 6 (46,15%) цитокін залишився в межах 30-100 пг/мл. Такі хворі потребують повторних аналогічних маніпуляцій.

Тривалість ефекту була суто індивідуальною. Так, у 4 пацієнтів з 24 (16,67%) за 8 місяців спостереження синтез ФНП-альфа не оновився; в інших – починав збільшуватися через 1,5–3 місяці після одноразової імунізації.

Імунізація автолейкоцитами позитивно впливала на клінічний перебіг хвороби. Практично у всіх хворих покращувався загальний стан, зменшувалися (або тимчасово зникали) шкірні прояви хвороби. У хворих на псоріатичний артрит біль в суглобах також зменшувався. Проте вплив на клінічні прояви хвороби потребує подальшого детальнішого вивчення.

У більшості хворих з низьким рівнем цитокіну (у 6 із 9) після імунізації виявити вміст ФНП-альфа у сироватці крові (як і до імунізації) не вдалося, проте у 3 пацієнтів (33,33%) відбувалось збільшення його вмісту від 0 до 5-8 пг/мл.

У хворих на ХГВ, що увійшли до дослідження, вміст ФНП-альфа був менший, ніж у хворих на псоріаз (не перевищував 180 пг/мл). Результати впливу імунізації на вміст ФНП-альфа наведені у табл. 2.

Як видно з наведених даних, у всіх хворих на ХВГ внаслідок імунізації автолейкоцитами також відбулось зменшення вмісту ФНП-альфа у сироватці крові. Одночасно в них покращився загальний стан, що проявилось зменшенням слабості та позитивним впливом на шкірні васкуліти; у пацієнтів з різними формами ураження нирок (6)

Таблиця 2.

Вплив одноразової імунізації автолейкоцитами на високий вміст ФНП-альфа (понад 30 пг/мл) у сироватці крові хворих на ХГВ

Вміст ФНП-альфа до імунізації автолейкоцитами (пг/мл)	Кількість хворих	Вміст ФНП-альфа через 30 днів після імунізації автолейкоцитами (пг/мл)		
		0-5	10-15	20-30
		Кількість хворих		
30-50	10	8	2	
51-70	5	4	1	
71- 90	2	1	0	1
100-180	1	0	1	
Разом	17	13 (76,47%)	4 (23,53%)	1 (5,88%)

нормалізувався або зменшився вміст креатиніну у сироватці крові.

Пояснити покращення клінічних проявів лише впливом на вміст ФНП-альфа неможливо, бо імунізація автолейкоцитами позитивно впливає на різні автоімунні процеси, які наявні у багатьох хворих з хронічними вірусними гепатитами. Проте головним у нашому дослідженні вважаємо доказ того, що випробуваний метод терапії пригнічує продукцію ФНП-альфа. До того ж у всіх пацієнтів з високим рівнем АлАТ відбулось його значне зменшення (або нормалізація), що теоретично вказує на послаблення запального процесу в гепатоцитах.

У результаті імунізації хворих на ХГВ, в яких вміст ФНП-альфа у сироватці крові взагалі не визначався (12), у 7 вміст його не змінився, проте в 5 (41,67%) він підвищився (в чотирьох до 5-10 пг/мл, а в одного – до 175 пг/мл). Важливо, що у хворого, в якого значно підвищився вміст цитокіну, загальний стан покращився та майже наполовину зменшилась концентрація ДНК ВГВ. Через 4 тижні у

нього зареєстровано зменшення вмісту ФНП-альфа до 35 пг/мл. Була проведена повторна імунізація цього пацієнта, і через 10 днів після імунізації вміст прозапального цитокіну вже становив 6 пг/мл.

Теоретично посилення продукції цитокіну у хворих на вірусний гепатит, в яких його вміст навіть не вдавалось встановити методом ІФА, свідчить про те, що імунізація автолейкоцитами може посилювати активність CD8+ Т-клітин, які виробляють різні цитокіни, зокрема ФНП-альфа. Це повинно позитивно впливати на ефективність лікування ХГВ, бо вважається, що CD8+ Т-клітини контролюють реплікацію HBV нецитолітичним шляхом і цей ефект опосередковується через інтерферон-гамма та ФНП-альфа [26].

Запропонована методика вимагає подальшої детальної розробки для уточнення схеми імунізації, з врахуванням клінічних проявів хвороби та індивідуального реагування на процедуру. Проте і сьогодні отримані результати свідчать про доцільність

включення цього методу в комплексну терапію захворювань з високою активністю ФНП-альфа. До того ж значно ширший діапазон цієї процедури призводить до зменшення вмісту преципітуючих холодових білків – криоглобулінів [20, 21]; на відміну від антитіл-інгібіторів ФНП-альфа може сприяти посиленню противірусного клітинного і гуморального імунітету [27- 29].

Висновки.

Встановлено, що внутрішньошкірна імунізація автолейкоцитами спри-

яє пригніченню надмірного інтенсивного синтезу прозапального цитокіну фактора некрозу пухлин – альфа у хворих із різними хворобами (зокрема, у хворих на псоріаз та ХГВ), вказує на доцільність її проведення у вигляді монотерапії або включення до комплексної терапії захворювань із високим вмістом цього цитокіну. Проте схема такої терапії (дозування, частота маніпуляцій, тривалість перерви між процедурами) потребує подальшого дослідження.

Література

1. Дранник Г.Н. Клиническая иммунология и аллергология. – М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2003. – 604 с.
2. Murphy Jo-Ellen, Robert Caroline, Kupper Thomas S Interleukin-1 and Cutaneous Inflammation: A Crucial Link Between Innate and Acquired Immunity *Journal of Investigative Dermatology* (2000) 114, 602–608.
3. Boris L. C and. Steinke J. W, 2. Cytokines and chemokines, ”*Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 111, no. 2, supplement, pp. S460–S475, 2003.
4. Gupta S., Gollapudi S. Molecular mechanisms of TNF-alpha-induced apoptosis in aging human T cell subsets. *Int. J Biochem Cell Biol* 2005; 37 (5): 1034-1042.
5. Tousoulis D, Antoniades C, Vassiliadou C, et al. Effects of combined administration of low dose atorvastatin and vitamin E on inflammatory markers and endothelial function in patients with heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2005; 7(7): 1126–32.
6. Gao B., Bataller R. Alcoholic Liver Disease: Pathogenesis and New Therapeutic Targets // *Gastroenterology*. – 2011. - Vol. 141, № 5. – P. 1572-1585.
7. Miller A. M., Horiguchi N., Jeong W. I. Et al. Molecular Mechanisms of Alcoholic Liver Disease: Innate Immunity and Cytokines // *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. – 2011. –Vol. 35, Issue 5. – P. 787–793
8. Neuman M. G. Cytokines in Alcoholic Liver // *Alcohol Research and Health*. – 2003. – Vol. 27. – P. 313–322.
9. Клиническая иммунология и аллергология. Под ред. Г. Лолора-младшого, Т. Фишера и Д. Адельмана. Пер. с англ. – М., Практика, - 2000. – 806 с.
10. Kathryn E. Wellen, Gökhan S. Hotamisligil. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest.* 2005; 115(5): 1111–1119.
11. Mann D.L. Inflammatory mediators and the failing heart: past, present, and the foreseeable future. *Circ. Res.*, 2002. 91(11): 988–998.
12. Tabet J.Y., Lopes M.E., Champagne S., Su J.B., Merlet P., Hittinger L. Inflammation, cytokines and anti-inflammatory therapies in heart failure. *Arch. Mal. Coeur Vaiss.*, 2002. 95(3): 204–212
13. Сигидин Я.А., Скуркович Б.С., Скуркович С.В., Лунина Г.В. / Новые подходы к биологической иммуномодулирующей терапии ревматоидного артрита: нейтрализация основных цитокинов // *Терапевтический архив*, 1998. – №5. – С. 32–37.

14. Granstein R.D. New treatments for psoriasis. *N Engl J Med* 2001; 345: 284-287.
15. Бадокин В.В. Перспективы применения ингибиторов ФНО при псориазе и псориатическом артрите // *Клин. фармакол. тер.* 2005, 14 (1), 76–79.
16. Ходан В.В. Динаміка показників функціонального стану апоптотичних, антиапоптотичних ангіогенезрегулюючих цитокінів (HGF, TNF-α) печінки у дітей з хронічним холецистохолангітом під впливом комплексного лікування тіотриазоліном та аскорутином / В.В. Ходан, А. Б. Волосянко // *Здоров'я дитини.* - 2013. - № 6(49). - С. 54-58.
17. Hepatocyte growth factor (HGF) and its therapeutic applications / Segura-Flores A.A., Gálvez-Gastélum F.J., Alvarez-Rodríguez A. [et al.] // *Rev. Gastroenterol. Mex.* – 2004. – № 69. – P. 243-250.
18. Regulation of microRNA expression by hepatocyte growth factor in human head and neck squamous cell carcinoma / D. Susuki, S. Kimura, S. Naganuma [et al.] // *Cancer Sci.* – 2011. – № 8. – P. 1349-1356.
19. Герасун Б.А., Чоп'як В.В., Ворожбит О.Б. Лечение аутоиммунных нарушений при хронических гепатитах В и С с помощью иммунизации аутолейкоцитами // *Мир вирусных гепатитов.* – Москва, 2006. – № 1. – С. 13–18.
20. Чоп'як В.В., Господарський І.Я., Герасун Б.А. Клінічний алгоритм надання медичної допомоги хворим на поліклоновий (змішаний) кріоглобулінемічний синдром – D 89.1. – Методичні рекомендації МОЗ України, Київ, 2006.
21. Герасун Б.А., Андрейчин М.А., Грицко Р.Ю. і співав. Застосування лейкоцитів у клітинній терапії // *Гепатологія*, 2012. – №2(16). – С. 4-17.
22. Патент України на винахід № 97461. Застосування способу вакцинації аутолейкоцитами як способу лікування ідіопатичної оліго- та астенозооспермії / Герасун Б.А., Копець Р.А.; опубліковано 10.02.2012, Бюл. №3.
23. Gerasun B. A., Holubovska O. A., Hrytsko R. Y., Zinchuk O. N., Shkurba A.V. Reduction of Hyperproduction of Thyroid Autoantibodies in Patients without Disturbance of the Thyroid Function: New Patents // *Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery* 2014, Vol. 8, No. 2. – P. 140-145.
24. Gerasun B, Kopets R, Hrytsko R, Gerasun O. Correction of fertility disorders in patients with cryoglobulinemia. *Central European Journal of urology* 2013; 66 (3): 316-9.
25. Herasun BA, Hrytsko RY. Original treatment method of frequently recurrent chronic herpetic infection caused by herpes simplex virus I and II types. *Centr Eur J Immunol* 2012; 37 (4): 362-4.
26. Phillips S., Chokshi S., Riva A. et al (2010). CD8+ T Cell Kontrol of Hepatitis B Virus Replikation: Direct Comprasion between Cytolytic and Noncitolytic Funstions. *The Journal of Immunol* 2010; 184:287-295.
27. Herasun BA, Hrytsko RY. Original treatment method of frequently recurrent chronic herpetic infection caused by herpes simplex virus I and II types. *Centr Eur J Immunol* 2012; 37 (4): 362-4.
28. Герасун О.Б. Перший досвід використання внутрішньошкірної імунізації неінактивованими аутолейкоцитами як лікувальної вакцини хронічного гепатиту В // *Гепатологія.* – 2015. – №3 (29). – С.30-40.
29. Герасун О.Б. Дослідження впливу внутрішньошкірної імунізації неінактивованими аутолейкоцитами на стан противірусного імунітету в хворих на ХГВ // *Гепатологія* 2016; 2 (32): 24–30.