

РІВЕНЬ TNF- ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ЯК ПРЕДИКТОР УСПІШНОГО ПРИЗНАЧЕННЯ БІОЛОГІЧНОЇ ТЕРАПІЇ У ПАЦІЄНТІВ З НЕСПЕЦИФІЧНИМ ВИРАЗКОВИМ КОЛІТОМ

О.Д. СЕЙДАЛІЄВА, А.І. КУРЧЕНКО

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, м. Київ

ВСТУП

У даний час неспецифічний виразковий коліт (НВК) є однією з найбільш серйозних проблем гастроентерології, у значній мірі завдяки невідомій етіології, складному патогенезу, рецидивуючому перебігу, небезпечним для життя ускладненням та малоефективному лікуванню [1]. Існує значне число досліджень, що свідчать про те, що в патогенезі НВК приймає участь безліч чинників: генетичні, фактори навколишнього середовища, компоненти кишкової мікрофлори, імунна система [2,3]. Виконані до теперішнього часу дослідження розкривають лише окремі сторони регуляції імунзапальної реакції у слизовій оболонці кишківника при даній патології. Персистенція імунзапального процесу в товстій кишці при НВК може бути пов'язана з надлишковою продукцією прозапальних цитокінів імунними клітинами (IL-1, IL-8, TNF- α та ін.) в результаті порушень в механізмах апоптозу. Реалізація апоптозу відбувається через специфічні рецептори, що відносяться до сімейства TNF- α – (Fas) та сімейства Bcl-2-генів.

Характерною гістологічною ознакою НВК є утворення між криптами слизової оболонки мікроабсцесів, так званих «крипт-абсцесів», що є скупченням поліморфноядерних лейкоцитів. Макрофаги також є одним з основних клітинних елементів запального інфільтрату при ЗЗК (запальних захворюваннях кишківника). Перші походять з циркулюючих моноцитів та складають 30-40% присутніх в слизовій оболонці кишки макрофагів, що розвивають і підтримують хронічний запальний процес в товстій кишці.

Запальний інфільтрат кишкової стінки при НВК представлений тими клітинами (переважно нейтрофілами і моноцитами), які мігрували сюди з периферичного кровотоку. Запалення слизової оболонки приводить до порушення рівноваги цитокінів, що і визначає особливості перебігу НВК.

Зміни цитокінової регуляції полягають в збільшенні продукції запальних цитокінів, перш за все TNF- α , а також інтерлейкінів (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12) при вираженому дисбалансі регуляторних цитокінів IL-10 та TGF- β . Одним з найбільш активних цитокінів з прозапальною дією є TNF- α , який разом з IFN- γ та IL-1 опосередкує відповіді

сповільненої гіперчутливості і активацію макрофагів. При запаленні цей цитокін стимулює Th1-хелпери і макрофаги, індукує системні реакції гострої фази з підвищеним синтезом IL-1, -2, -6, -8. Якщо підвищення IL-2 забезпечує аутокринну стимуляцію Т-лімфоцитарної проліферації і стимулює зростання В-лімфоцитів, функціональну активність натуральних кілерів, приводить до активації макрофагів, а значить клональної проліферації і диференціювання лімфоцитів, то IL-8 стимулює хемотаксис і викликає активацію Т-лімфоцитів з утворенням кисневих радикалів і вивільненням лізосомальних ферментів [4].

Мета роботи. Вивчити *in vivo* продукцію TNF- мононуклеарними клітинами периферичної крові пацієнтів з неспецифічним виразковим колітом різного ступеня тяжкості.

Матеріали та методи дослідження. Під спостереженням знаходились 2 групи пацієнтів. У рамках нашої роботи було досліджено 30 хворих на НВК. Критерії включення: легкий, середньо-тяжкий та тяжкий перебіг НВК, визначені за індексом Мейо та Монреальською шкалою активності хвороби. Діагностика та лікування НВК проводилась відповідно до критеріїв діючого наказу Міністерства охорони здоров'я України від 11.02.2016 р. № 90 «Про затвердження та впровадження медико-технологічних документів зі стандартизації медичної допомоги при запальних захворюваннях кишечника». Серед досліджених 20 осіб склали чоловіки віком від 27 до 81 року, 10 – жінки віком від 28 до 58 років. Згідно з Монреальською класифікацією, 5 пацієнтів мали тяжкий перебіг захворювання, 5 – легкий, 20 – перебіг помірної важкості.

Групу контролю склали 10 практично здорових осіб, мешканців Херсонської області. Критерієм виключення була наявність аутоімунної патології.

Результати клініко-лабораторних досліджень, а також детальні анамнестичні дані реєструвались в індивідуальних тематичних картах (авторських).

Досліджено сироваку крові пацієнтів та здорових донорів. Вміст цитокіну TNF- α периферичної крові визначали за допомогою імуноферментного методу (ELISA) з використанням набору реагентів А-8756 «Вектор «Бест». Тестування

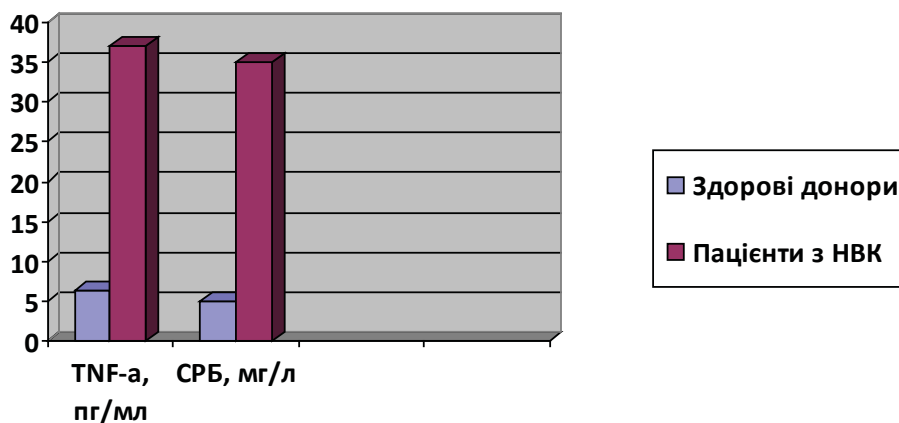
проводилось за допомогою імуноферментного аналізатора «Stat Fax-303 Plus». Статистичний аналіз даних проведено за допомогою програми «Statistica10».

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.

У каскаді прозапальних цитокінів ключове значення належить фактору некрозу пухлини (TNF-), що має запальну та імунорегуляторну активність. Цей цитокін синтезується моноцитами, макрофагами і Т-клітинами, дендритними клітинами, Т- і В-лімфоцитами, нейтрофілами, NK-клітинами, кератиноцитами, астроцитами, ендотеліальними і гладком'язовими клітинами і має широкий спектр біологічних ефектів. Він підвищує експресію клітинних і судинних молекул адгезії-1, які беруть участь в міграції лім-

фоцитів в зону запалення, активує лімфоцити і проліферацію фібробластів, стимулює синтез простагландинів, лейкотрієнів, оксиду азоту і матриксних металопротеїназ.

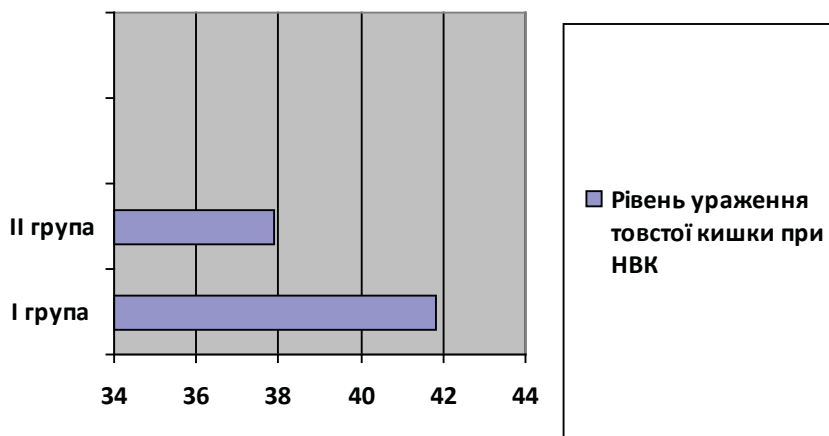
У сироватці крові здорових донорів біологічно активний TNF- визначався в дуже низьких концентраціях (6,4±1,2 пг/мл), в той час як у пацієнтів з НВК склав 37±8,7 пг/мл (Мал.1). TNF-разом з IL-1, IL-6 змушують печінку продукувати білки гострої фази, такі як С-реактивний білок (у пацієнтів з НВК склав 35 мг/л при нормі до 5 мг/л), діють на гіпоталамус як ендогенний пептид, викликаючи жар і приводячи до переміщення нейтрофілів з кісткового мозку в кров (лейкоцитоз). Головним джерелом TNF- є макрофаги.



Мал. 1. Значення TNF- та СРБ сироватки крові у пацієнтів НВК

У роботі ми поділили пацієнтів на 2 групи: перша – пацієнти з легким та середньої важкості перебігом НВК, друга – з важким перебігом захворювання. У першій групі рівень TNF- склав 40,06±1,88 пг/мл, у другій – 40,02±3,47 пг/мл, t критерій Ст'юдента склав 0,91, p=0,37, тобто показники достовірно статистично не відрізнялися.

Те саме відбулося при спробі розподілити пацієнтів з урахуванням рівня ураження товстої кишки: I група – лівобічне ураження, II – субтотальне та тотальне ураження. Рівень TNF- у 1-й групі склав 41,82±2,5 пг/мл, у 2-й 37,88±1,88 пг/мл, t критерій Ст'юдента склав 1,24, p=0,23, що також статистично не відрізнялися (Мал. 2).



Мал.2. Рівень TNF- у пацієнтів з лівобічним (I група), субтотальним та тотальним ураженням товстої кишки НВК (II група)

TNF- α разом з IL-1 підвищують проникність судин, полегшують міграцію клітин в тканини, збільшують експресію молекул адгезії на лейкоцитах і клітинах ендотелію. Відносно запальних захворювань товстої кишки TNF- α має можливість направляти циркулюючі запальні клітини в осередок запалення, що викликає набряк, ініціює коагуляцію і грає важливу роль в патогенезі НВК.

Усупереч сталим уявленням про місцеву продукцію та метаболізм цитокінів, в системному кровотоці вони можуть циркулювати у вільному і зв'язаному станах.

Концентрації зв'язаних форм цитокінів, що не виявляються методом ІФА, значно перевищують рівні вільних медіаторів. Проте за певних умов рівні IL-1 α і TNF- α підвищуються в крові за рахунок дисоціації мембрано- та рецепторзв'язаних форм, викликаючи ефекти гіперцитокінемії [5]. У активній формі цитокіни продукуються, головним чином, в позаклітинний простір, тому при тестуванні сироваткових рівнів медіаторів слід враховувати відносну інформативність показників, що не відображають вміст латентних форм.

Продукція цитокінів *in vitro* відображає функціональний стан клітин імунної системи: спонтанна продукція в культурі свідчить про активацію клітин *in vivo*, а індукований *in vitro* мітогенами синтез цитокінів виявляє резервні можливості клітин відповідати на антигенний стимул. Гіперпродукція або зниження спонтанної/індукованої секреції медіаторів запалення може служити однією з ознак імунодефіцитного стану. Тому неінформативні в специфічній діагностиці, гуморальні чинники імунної системи – цитокіни – можуть бути значимі в оцінці тяжкості і прогнозу течії запального процесу.

Більшість досліджень з визначенням спонтанної та стимульованої продукції медіаторів імунної системи ґрунтована на тестуванні сироваткових фракцій, що містять, окрім усього іншого, і розчинні рецептори до них [6,7].

Тому видається доцільним дослідження *in vitro* стимульованої продукції цитокінів виділеними з периферичної крові мононуклеарними клітинами в кондиційному середовищі.

ВИСНОВКИ:

1. Виконані дослідження свідчать про збільшення рівня прозапального цитокіну TNF- α у сироватці крові хворих НВК у порівнянні зі здоровими донорами, вказуючи на можливу участь цього цитокіну в механізмах розвитку захворювання.
2. Рівень TNF- α периферичної крові не мав позитивної чи негативної кореляції з важкістю перебігу та рівнем ураженням НВК, тож не може бути використаний з метою діагностики активності НВК та прогнозу необхідності

застосування біологічної терапії у пацієнтів НВК.

3. Аналіз динаміки рівня TNF- α у порівнянні зі здоровими донорами свідчить про посилення функціональної активності клітин моноцитарно-макрофагального ряду, але потребує подальшого дослідження *in vitro* стимульованої продукції TNF- α виділеними з периферичної крові мононуклеарами.

ЛІТЕРАТУРА:

4. Павленко В.В., Александрова С.Б., Кораблина Н.В. Влияние инфликсимаба на некоторые показатели провоспалительных цитокинов и нейропептидов при язвенном колите/ 2015 – №4 – С.66-69
5. Павленко В.В., Катаганова Г.А. Некоторые показатели воспаления при язвенном колите как маркеры клинического ответа на биологическую терапию.//Международный научный институт «Educatо». -2015 – №3-Т.10- С.121-124
6. Baumgart D.C., Carding S.R. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology/ Lancet -2007 – V/369
7. Strober W., Fuss I.J. Pro-Inflammatory Cytokines in the Pathogenesis of IBD, Gastroenterology. 2011; 140(6): 1756-1767.
8. Pathak S., Grillo A.R, Scarpa M. et al. MiR-155 modulates the inflammatory phenotype of intestinal myofibroblasts by targeting SOCS1 in ulcerative colitis. Experimental & Molecular Medicine. 2015; 47: e164.
9. Belokopytova I.S. Diagnostic value of some markers of immune inflammation in ischemic heart disease // Russian Immunology Journal. 2014. Vol. 8, No. 3. P. 509-512.
10. Tsarenok S.Yu., Gorbunov V.V., Tereshkov P.P. The level of interleukin-1p, tumor necrosis factor and their dissolving receptors in women with ischemic heart disease, comorbid with osteoporosis // Clinical Laboratory Diagnostics. 2015. Vol. 60, No. 3. P. 48-59.

РЕЗЮМЕ

РІВЕНЬ TNF- α ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ЯК ПРЕДИКТОР УСПІШНОГО ПРИЗНАЧЕННЯ БІОЛОГІЧНОЇ ТЕРАПІЇ У ПАЦІЄНТІВ З НЕСПЕЦИФІЧНИМ ВИРАЗКОВИМ КОЛІТОМ

СЕЙДАЛІЄВА О.Д., КУРЧЕНКО А.І.

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, м. Київ

Вступ. У даний час неспецифічний виразковий коліт (НВК) є однією з найбільш серйозних проблем гастроентерології, у значній мірі завдяки невідомій етіології, складному патогенезу, рецидивуючому пе-

ребігу, небезпечним для життя ускладненням та малоефективну лікуванню. Виконані до теперішнього часу дослідження розкривають лише окремі сторони регуляції імунзапальної реакції у слизовій оболонці кишківника при даній патології. Персистенція імунзапального процесу в товстій кишці при НВК може бути пов'язана з надлишковою продукцією прозапальних цитокінів імунними клітинами (IL-1, IL-8, TNF- α та ін.) в результаті порушень в механізмах апоптозу.

Мета роботи. Вивчити *in vivo* продукцію TNF- α мононуклеарними клітинами периферичної крові пацієнтів з неспецифічним виразковим колітом різного ступеня тяжкості.

Матеріали та методи дослідження. Під спостереженням знаходились 2 групи пацієнтів. У рамках нашої роботи було досліджено 30 хворих на НВК. Критерії включення: легкий, середньо-тяжкий та тяжкий перебіг НВК, визначені за індексом Мейо та Монреальською шкалою активності хвороби.

Серед досліджених 20 осіб склали чоловіки віком від 27 до 81 року, 10 – жінки віком від 28 до 58 років. Згідно з Монреальською класифікацією, 5 пацієнтів мали тяжкий перебіг захворювання, 5 – легкий, 20 – перебіг помірної важкості.

Групу контролю склали 10 практично здорових осіб, мешканців Херсонської області. Критерієм виключення була наявність аутоімунної патології.

Досліджено сироватку крові пацієнтів та здорових донорів. Вміст цитокіну TNF- α визначали за допомогою імуноферментного методу (ELISA) з використанням набору реагентів А-8756 «Вектор «Бест». Тестування проводилось за допомогою імуноферментного аналізатора «Stat Fax-303 Plus». Статистичний аналіз даних проведено за допомогою програми «Statistica 10».

Результати. У сироватці крові здорових донорів біологічно активний TNF- α визначався в дуже низьких концентраціях ($6,4 \pm 1,2$ пг/мл). У той час як у пацієнтів з НВК склав $37 \pm 8,7$ пг/мл. TNF- α разом з IL-1, IL-6 змушують печінку продукувати білки гострої фази, такі як С-реактивний білок (у пацієнтів з НВК склав 35 мг/л при нормі до 5 мг/л).

У роботі ми поділили пацієнтів на 2 групи: перша – пацієнти з легким та середньої важкості перебігом НВК, друга – з важким перебігом захворювання. У першій групі рівень TNF- α склав $40,06 \pm 1,88$ пг/мл, у другій – $40,02 \pm 3,47$ пг/мл, *t* критерій Ст'юдента склав 0,91, *p*=0,37, тобто показники достовірно статистично не відрізнялися.

Те саме відбулося при спробі розподілити пацієнтів з урахуванням рівня ураження товстої кишки: I група – лівобічне ураження, II – субтотальне та тотальне ураження. Рівень TNF- α у 1-й групі склав $41,82 \pm 2,5$ пг/мл, у 2-й $37,88 \pm 1,88$ пг/мл, *t* критерій Ст'юдента склав 1,24, *p*=0,23, що також статистично не відрізнялися.

Висновки. Аналіз динаміки рівня TNF- α у порівнянні зі здоровими донорами свідчить про посилення функціональної активності клітин моноцитарно-макрофагального ряду, але потребує подальшого дослідження *in vitro* стимульованої продукції TNF- α виділеними з периферичної крові мононуклеарами.

Ключові слова: неспецифічний виразковий коліт (НВК), TNF- α , ІФА.

РЕЗЮМЕ

УРОВЕНЬ TNF- α ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ КАК ПРЕДИКТОР УСПЕШНОГО НАЗНАЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ У ПАЦИЕНТОВ С НЕСПЕЦИФИЧЕСКИМ ЯЗВЕННЫМ КОЛИТОМ

СЕЙДАЛИЕВА О.Д., КУРЧЕНКО А.И.

Национальный медицинский университет имени А.О. Богомольца, г. Киев

Вступление. В настоящее время язвенный колит (НЯК) является одной из наиболее серьезных проблем гастроэнтерологии, в значительной мере благодаря неизвестной этиологии, сложному патогенезу, рецидивирующему течению, опасным для жизни осложнениям и малоэффективному лечению. Выполненные до настоящего времени исследования раскрывают лишь отдельные стороны регуляции иммунораздражительной реакции в слизистой оболочке кишечника при данной патологии. Персистенция иммунораздражительного процесса в толстой кишке при НЯК может быть связана с избыточной продукцией провоспалительных цитокинов иммунными клетками (IL-1, IL-8, TNF- α и др.) в результате нарушений в механизмах апоптоза.

Цель работы. Изучить *in vivo* продукцию TNF- α мононуклеарными клетками периферической крови пациентов с неспецифическим язвенным колитом разной степени тяжести.

Материалы и методы исследования. Под наблюдением находилось 2 группы пациентов. В рамках нашей работы было исследовано 30 больных НЯК. Критерии включения: легкое, средне-тяжелое и тяжелое течение НЯК, определенные с помощью индекса Мейо и Монреальской шкалы активности болезни.

Среди исследованных 20 лиц составили мужчины в возрасте от 27 до 81 года, 10 – женщины в возрасте от 28 до 58 лет. Согласно Монреальской классификации, 5 пациентов имели тяжелое течение заболевания, 5 – легкое, 20 – умеренной тяжести.

Группу контроля составили 10 практически здоровых лиц, жителей Херсонской области. Критерием исключения было наличие аутоиммунной патологии.

Исследована сыворотка крови пациентов и здоровых доноров. Уровень цитокина TNF- α определяли с помощью иммуноферментного метода (ELISA) с использованием набора реагентов А-8756 «Вектор «Бест». Тестирование проводилось с помощью иммуноферментного анализатора «Stat Fax-303 Plus». Статистический анализ данных проведен с помощью программы «Statistica 10».

Результаты. В сыворотке крови здоровых доноров биологически активный TNF- α определялся в очень низких концентрациях ($6,4 \pm 1,2$ пг / мл), в то время как у пациентов с НЯК составил $37 \pm 8,7$ пг/мл. TNF- α вместе с IL-1, IL-6 вынуждают печень продуцировать белки острой фазы, такие как С-реактивный белок (у пациентов из НЯК составил 35 мг/л при норме до 5 мг/л).

В работе мы разделили пациентов на 2 группы: первак – пациенты с легким и среднетяжелым течением НЯК, вторая – с тяжелым течением заболевания. В первой группе уровень TNF- α составил $40,06 \pm 1,88$ пг/мл, во второй – $40,02 \pm 3,47$ пг/мл, t критерий Стьюдента составил 0,91, $p=0,37$, то есть показатели достоверно статистически не отличались.

То же отмечено при попытке распределить пациентов с учетом уровня поражения толстой кишки: I группа – левостороннее поражение, II – субтотальное и тотальное поражение. Уровень TNF- α в 1-й группе составил $41,82 \pm 2,5$ пг/мл, во 2-й – $37,88 \pm 1,88$ пг/мл, t критерий Стьюдента составил 1,24, $p=0,23$, что также статистически не отличалось.

Выводы. Анализ динамики уровня TNF- α в сравнении со здоровыми донорами свидетельствует об усилении функциональной активности клеток моноцитарно-макрофагального ряда, но требует дальнейшего изучения *in vitro* стимулируемой продукции TNF- α выделенными из периферической крови мононуклеарами.

Ключевые слова: неспецифический язвенный колит (НЯК), TNF- α , ИФА.

SUMMARY

LEVEL OF TNF-A IN PERIPHERAL BLOOD AS THE PREDICTOR OF THE SUCCESSFUL SETTING OF BIOLOGICAL THERAPY FOR PATIENTS WITH ULCERATIVE COLITIS

Seidaliieva O.D., Kurchenko A.I.

Bogomolets National Medical University, Kyiv

Introduction. Presently ulcerative colitis (UC) is one of the most serious problems of gastroenterology, due to unknown etiology, difficult pathogenesis, by dangerous for life complications and ineffective treatment. The researches executed to present tense expose only separate parties of immunoinflammatory reaction in the mucous membrane in this pathology. Persistence of immunoinflammatory process in colon with UC can be related to the products of proinflammatory cytokines by immune cages (IL-1, IL-8, TNF- α and other) as a result of the broken apoptosis mechanisms.

Aim. To study *in vivo* products of TNF- α by the mononuclear cells of peripheral blood of the patients with ulcerative colitis of different illness degree.

Materials and methods. There were 2 groups of observation. In our work we investigated 30 patients with UC. Criteria of including were an easy, moderate and severe UC flowing. It was estimated by Mayo index and Monreal scale of activity of illness.

In the group of observation there were 20 men in the age from 27 till 81 years old, 10 women, in age from 28 to 58. Concern to Monreal classification, 5 patients had a severe flow of the disease, 5 – easy, 20 – the moderate one.

A control group was made by 10 practically healthy persons, leaving in Kherson region. The exception criteria was the presence of autoimmune pathology.

Blood serum of patients and healthy donors was investigated. Level of TNF- α was determined by ELISA with the use of set of reagents of A-8756 «Vector «Best». Testing was conducted by ELISA analyzer of «Stat Fax-303 Plus». The statistical data analysis was conducted by the program «Statistica10».

Results. In the serum of healthy donors bioactive TNF- α was determined in very subzero concentrations ($6,4 \pm 1,2$ pg/ml), while for patients with UC it was $37 \pm 8,7$ pg/ml. TNF- α with IL-1, IL-6 make liver to product proteins of sharp phase, such as C-reactive protein (for UC patients the level of CRP was 35 mg/l, normal level is 5 mg/l).

In this work, we divided the patients into 2 groups: the first one – patients with mild and moderate UC course, the second – with severe course of the disease. In the first group, the level of TNF- α was $40,06 \pm 1,88$ pg/ml, in the second group – $40,02 \pm 3,47$ pg/ml, t Student's criteria was 0,91, $p=0,37$, i.e. not statistically sig. The same is noted when trying to distribute patients with regard to the level of colon damage: Group I – left-sided lesion, II – subtotal and total lesion. The level of TNF- α in the 1st group was $41,82 \pm 2,5$ pg/ml, in the 2nd group – $37,88 \pm 1,88$ pg/ml, t Student's criteria was 1,24, $p=0,23$ that also did not statistically differ.

Findings. Analysis of the dynamics of TNF- α in comparison with healthy donors indicates an increase in the functional activity of monocyte-macrophage cells, but does not require further study *in vitro* of stimulated TNF- α production of mononuclear cells isolated from peripheral blood.

Keywords: nonspecific ulcerative colitis (UC), TNF- α , ELISA.