

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

УДК 616.98.578.828.2:616.441.

**НОВИЙ МЕТОД ЗМЕНШЕННЯ АКТИВНОСТІ ІМУННОГО
ПРОЦЕСУ ПО ВІДНОШЕННЮ ДО АВТОАНТИГЕНІВ ЩИТОВИДНОЇ
ЗАЛОЗИ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ГЕПАТИТ С**

Б.А. Герасун¹, О.А. Голубовська², Р.Ю. Грицко¹, О.М. Зінчук¹, А.В. Шкурба²

¹Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького

²Національний медичний університет ім. А.А. Богомольця, м. Київ

Ключові слова: гепатит С, інтерферонотерапія, антитиреоїдні антитіла, імунізація аутолейкоцитами.

**НОВЫЙ МЕТОД УМЕНЬШЕНИЯ АКТИВНОСТИ
ИММУННОГО ПРОЦЕССА ПО ОТНОШЕНИЮ
К АУТОАНТИГЕНАМ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ
У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ С**

Б.А. Герасун, О.А. Голубовская, Р.Ю. Грицко, А.Н. Зинчук, А.В. Шкурба

В статье рассматривается принципиально новый оригинальный метод подавления интенсивности иммунного процесса против аутоантигенов щитовидной железы. Показано, что иммунизация аутолейкоцитами способствует уменьшению синтеза антител к тиреоглобулину и тиреопероксидазе, в т.ч. индуцированного интерферонотерапией.

Ключевые слова: гепатит С, интерферонотерапия, антитиреоидные антитела, иммунизация аутолейкоцитами.

**A NEW METHOD OF DECREASING THE ACTIVITY
OF THE IMMUNE PROCESS IN RELATION TO THE THYROID
AUTOANTIGENS IN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C**

B.A. Gerasun, O.A. Holubovska, R. Yu. Hrytsko, A.N. Zinchuk, A.V. Shkurba

The article discusses a fundamentally new original method for suppressing the intensity of the original immune process against self antigens of the thyroid gland. It is shown that immunization by autoleukocytes reduces synthesis of antibodies to thyroglobulin and thyroid peroxidase, including induced interferonotherapy.

Key words: hepatitis C, interferon therapy, antithyroid antibodies, immunization with leucocytes.

Вступ. Чинники, що сприяють розвитку автоімунного процесу стосовно щитовидної залози, поділяють на внутрішні та зовнішні. До внутрішніх відносять генетичні, до зовнішніх – чинники, які призводять до порушення гістогематичного бар'єра та спричиняють контакт антигенів щитовидної залози з лімфоцитами [1-4]. Серед останніх важливе місце займають бактерійні і вірусні інфекції, у першу чергу, хронічний гепатит С (ХГС). Отримані численні переконливі дані про розвиток автоімунних процесів у хворих на ХГС, особливо під час інтерферонотерапії [4-8].

Відомо, що вірус гепатиту С є тригерним чинником, що запускає різноманітні автоімунні процеси [9, 10]. Механізм розвитку автоімунних процесів стосовно антигенів щитовидної залози вивчений недостатньо. Вважається, що HCV може безпосередньо або опосередковано індукувати тиреоїдне запалення [6].

Припускається також, що може

мати значення і характерна для вірусу гепатиту С молекулярна мімікрія [2, 6]. Здатність збудника хвороби маскуватися під антигени макроорганізму призводить до послаблення імунної відповіді та полегшує проникнення вірусу до клітин хазяїна. [10, 11].

За даними літератури, антитиреоїдні антитіла виявлять у 20–40% хворих на ХГС [5, 12]. Хоча сам по собі підвищений рівень антитіл до автоантигенів щитовидної залози не є підставою для підтвердження ураження щитовидної залози. Він свідчить про автоімунний процес, що може завершитися розвитком тиреоїдиту. Особливо небезпечним є наростання антитіл до автоантигенів щитовидної залози у хворих на гепатит С внаслідок імуномодуючого ефекту інтерферону [5-8].

Способи зменшення активності клітинного і гуморального імунітету щодо антигенів щитовидної залози у пацієнтів без ознак тиреоїдиту

практично не розроблені. Саме тому стосовно хворих, у крові яких підвищений рівень антитіл до тиреопероксидази і тиреоглобуліну, але нема ознак порушення функції щитовидної залози, зазвичай обмежуються спостереженням. Метою спостереження є раннє виявлення і своєчасний початок лікування тиреоїдиту.

У хворих на ХГС, особливо в період інтерферонотерапії, часто розвивається або значно посилюється попередній автоімунний процес [1, 4, 7]. До того ж, наростання антитіл до тиреопероксидази і до тиреоглобуліну (на відміну від хворих без ХГС) відбувається швидко та інтенсивно, тому виникає необхідність зменшення рівня автоімунного процесу.

Відомий метод пригнічення потужних автоімунних процесів різного ґенезу передбачає призначення імуносупресивних препаратів, зокрема, застосовуються глюкокортикостероїдні гормони, а також нестероїдні протизапальні препарати [13]. Проте у цих препаратів широкий спектр небажаної побічної дії, до того ж, знижуючи імунітет, вони сприяють посиленню реплікації вірусу. На тлі інтерферонотерапії ХГС така терапія практично не впливає на синтез автоантитіл до щитовидної залози.

Саме тому на сьогодні основним

способом зменшення гіперергічності автоімунних процесів, що виникають (або посилюються) під час інтерферонотерапії, є зменшення дози інтерферону або повне припинення противірусної терапії. Проте, навіть передчасне припинення інтерферонотерапії часто не зупиняє вже запущений автоімунний процес, не призводить до швидкого зменшення титру автоантитіл, проте є причиною зменшення (чи втрати) досягнутого ефекту противірусної терапії ХГС [7].

У зв'язку з цим *метою нашої роботи* була розробка способу імунотерапії хворих на ХГС із порушенням толерантності до антигенів щитовидної залози для зменшення ризику розвитку автоімунного тиреоїдиту під час інтерферонотерапії.

Для цього ми випробували застосування внутрішньошкірної імунізації автолейкоцитами [14, 15] уперше як спосіб лікування хворих із порушенням толерантності до антигенів щитовидної залози, особливо під час інтерферонотерапії ХГС. Встановлено, що внутрішньошкірна імунізація автолейкоцитами позитивно впливає на стан клітинного і гуморального імунітету, що підтверджується зменшенням проявів системних васкулітів і зниженням концентрації кріоглобулінів у крові [16].

Передумовою для використання

цього методу терапії автоімунних станів є той факт, що автоімунні хвороби можна пасивно переносити за допомогою автореактивних Т-лімфоцитів. Тому, по аналогії з вакцинами, що застосовуються для профілактики інфекційних хвороб, у лікуванні автоімунних станів почали використовувати автореактивні лімфоцити зі збереженою імуногенністю [17]. Механізм дії таких вакцин пояснюють тим, що введення автореактивних клітин підвищує активність опосередкованої лімфоцитами імунної відповіді за рахунок генерації цитотоксичних лімфоцитів. Важливим є і процес корекції сітки Ерне – антиідіотипової регуляції імунної відповіді, що підтверджується збільшенням кількості в сироватці крові антиідіотипових антитіл після імунізації лейкоцитами. Ще один механізм може включатися при цій імунній маніпуляції: активація CD3+, CD4+, CD25+ лімфоцитів, а також CD3+, CD8+, CD28+ лімфоцитів, одночасно з блокуванням Fc-рецепторів, а також глікопротеїнових, лектинових рецепторів на В-лімфоцитах [17].

Матеріали і методи. Дослідження проводили у двох групах хворих на ХГС (1 генотип HCV) із порушенням толерантності до антигенів щитовидної залози. До 1-ї групи увійшли 22 пацієнти з хронічним гепатитом С, які не отримували противірусної

терапії, до 2-ї – 20 пацієнтів під час лікування пегільованим інтерфероном та рибавірином. Лікування проводили по стандартній схемі противірусної терапії.

В обох групах хворих переважали жінки: у 1-й групі їх було 17 (77,27 %), у 2-й – 16 (80,0 %). Розподіл за віком та особливостями клінічного перебігу хворих був однотипний.

Хворі, відібрані до обох груп, стояли на обліку у зв'язку із ХГС (діагноз хвороби був підтверджений наявністю у крові вірусної РНК та антитіл до HCV). Згідно клінічних даних, а також результатів морфологічного обстеження (або фібротесту), у хворих не було цирозу печінки. Усім хворим проводили УЗД щитовидної залози.

Антитіла до тиреоглобуліну, тиреопероксидази та гормони щитовидної залози – трийодтиронін вільний (T₃-вільний), тироксин загальний (T₄) та тиреотропний гормон (ТТГ) – визначали імунохімічним методом із електрохемілюмінесцентною детекцією (ECLIA), використовуючи аналізатор Cobas 6000; тест-системи „RocheDiagnostics” (Швейцарія). Дослідження виконували у лабораторії „Synovo”.

Пацієнти, що увійшли в групу дослідження, не мали змін у будові та функції щитовидної залози (консультовані у ендокринолога, ознаки тиреоїдиту не були виявлені).

Методика **ізоімунізації** складається із двох фаз: виділення лейкоцитів із периферичної крові пацієнта та їх внутрішньошкірного введення.

Виділення лейкоцитів. Лейкоцити виділяють шляхом відстоювання гепаринізованої венозної крові хворого на хронічний гепатит із ознаками порушення імунологічної толерантності до тканини щитовидної залози (рівень вмісту антитіл до тиреопероксидази і до тиреоглобуліну в 5 і більше разів перевищує показник, прийнятий за допустимий). Для цього венозну кров об'ємом 40-60 мл набирають у флакон із гепарином із розрахунку 50 од. гепарину на 10 мл крові (об'єм залежить від кількості лейкоцитів у 1 мл крові). Розливають по 10 мл у пробірки і під кутом 45° інкубують у термостаті при температурі 37°C протягом 90-140 хвилин. Плазму крові обережно, не допускаючи перемішування, відсмоктують, лейкоцити двічі відмивають у 5-10-кратному об'ємі охолодженого 0,9 % розчину натрію хлориду центрифугуванням при 200 g протягом 5 хв. Осад ресуспендують у 1,0-1,5 мл ізотонічного розчину натрію хлориду (вміст лейкоцитів повинен складати $\geq 10-15 \times 10^6$ кл/мл).

Маніпуляції для виділення клітин проводять стерильно.

Ізоімунізація. Автоклітини периферичної крові вводили хворим із підвищеним вмістом антитіл до тиреопероксидази і тиреоглобуліну у сироватці крові. Автолейкоцити

вводили внутрішньошкірно за допомогою шприца (до утворення лимонної кірочки) по 0,1 мл в 8-12 точок у шкіру спини (між лопатками). Через 10-12 днів, 30, 60 і 180 днів визначали рівень антитіл до тиреопероксидази і тиреоглобуліну. При необхідності імунізацію повторювали (індивідуально, з урахуванням особливостей перебігу хвороби).

Результати та їх обговорення.

Ефективність методу підтверджується результатами спостереження за пацієнтами із підвищеним вмістом антитіл до щитовидної залози при повній відсутності клінічних і лабораторних ознак тиреоїдиту. У табл. 1 наведені результати лікування хворих на ХГС, що не отримували протівірусної терапії.

З даних наведених у таблиці 1 видно, що після одноразової імунізації автолейкоцитами концентрація антитіл до щитовидної залози знизилася в усіх хворих. При цьому зменшення в сироватці крові вмісту антитіл до тиреопероксидази на половину і більше відбулося у 8 хворих (36,36 %), а повна нормалізація показника – у 6 пацієнтів (27,27 %). Аналогічні показники рівня антитіл до тиреоглобуліну становили відповідно 45,45 % та 13,64 %.

Після повторної імунізації, проведеної через 30–40 днів, нормалізація рівня автоантитіл до тиреопероксидази спостерігалась у 14 хворих (ефективність лікування досягла 63,64 %), а до тиреоглобуліну – у 7 (31,82 %).

Таблиця 1

Ефективність лікування порушеної толерантності до автоантигенів щитовидної залози у хворих на ХГС, що не отримували інтерферонотерапії (за даними обстеження через 10-12 днів після одноразової імунізації автолейкоцитами)

Показник ефективності лікування	Антитіла до тиреопероксидази		Антитіла до тиреоглобуліну	
	К-ть хворих (n=22)	%	К-ть хворих (n=22)	%
Зниження концентрації антитіл (у %)				
До 20	0	0	0	0
21- 30	1	4,55	1	4,55
31-39	3	13,64	3	13,64
40-49	4	18,18	5	22,73
50-99	8	36,36	10	45,45
нормалізація	6	27,27	3	13,64

Стабільність досягнутого ефекту коливалася в широких межах, носила індивідуальний характер, проте нормалізація рівня антитіл у 70-80 % хворих зберігалася впродовж 6-12 місяців.

Результати пригнічення автоімунного процесу у хворих на ХГС у період противірусної терапії інтерфероном істотно відрізняються. Ці відмінності полягають у значно меншій ефективності імунізації

автолейкоцитами (таб. 2).

З наведених у таблиці 2 даних видно, що на відміну від пацієнтів I групи, у хворих, які отримували противірусну терапію, повної нормалізації концентрації автоантитіл у результаті одноразової імунізації автолейкоцитами досягти не вдалося в жодному випадку. Хоча ефективність впливу на автоімунний процес у період інтерферонотерапії виявилася істотно меншою, все ж таки, загальна частота

Таблиця 2

Ефективність лікування порушеної толерантності стосовно автоантигенів щитовидної залози у хворих на ХГС у період інтерферонотерапії

Показник ефективності лікування	Антитіла до тиреопероксидази		Антитіла до тиреоглобуліну	
	К-ть хворих (n=22)	%	К-ть хворих (n=22)	%
Зниження концентрації антитіл (у %)				
До 20	3	15	1	5
21- 30	2	10	3	15
31-39	7	35	7	35
40-49	4	20	5	25
>50	4	20	4	20
нормалізація	0	0	0	0

зниження рівня антитіл до тиреопероксидази і тиреоглобуліну, як і в 1-й групі хворих, склала 100 %.

Стабільність досягнутого результату також була значно меншою і коливалася в межах від 1 до 6 місяців (у першій групі складала 6-12 місяців). Проте імунізація автолейкоцитами істотно стримувала процес утворення автоантитіл і дозволила закінчити інтерферонотерапію без перерв і без зменшення дози препарату, що позитивно впливало на ефективність елімінації вірусу. Це положення можна проілюструвати наступними клінічними прикладами.

Хвора Р., 59 років. Вірусний гепатит С виявлений в 2007 р. (1-й генотип HCV). Було призначено лікування інтроном А по 3 млн. 3 рази на тиждень, рибавірином по 1000 мг/доб. До нас хвора звернулася через місяць після початку інтерферонотерапії. При огляді та лабораторному обстеженні виявлена кріоглобулінемія, часто рецидивуючий кріоглобулінемічний васкуліт шкірних покривів. Рівень РНК вірусу низький (18 300 копій/мл), активність АлАТ – 1,54 ммоль/л; гематологічні показники, рівень креатиніну і сечовини в сироватці крові – в нормі. Виявлені: підвищений рівень антитіл до тиреоглобуліну (200 МО/мл; референтне значення до 150 МО/мл) і до тиреопероксидази (280 МО/мл; референтне значення до 34 МО/мл); гормони щитовидної залози у межах норми. При повторному обстеженні через 45 днів стан хворої істотно не

змінився, привертало увагу швидке наростання концентрації антитіл до тиреоглобуліну – 500 МО/мл (при попередньому обстеженні – 200), тобто за півтори місяці показник збільшився в 2,5 рази. Зберігався дрібноточковий геморагічний висип, посилювалося почуття холоду, відчуття скутості в дрібних суглобах рук, акроціаноз. Таким чином, на тлі противірусної терапії зберігалися симптоми кріоглобулінемії, посилювалася продукція антитіл до антигенів щитовидної залози. Лікування продовжували. При наступному обстеженні, також через 45 днів, виявити HCV RNA не вдалося, активність АлАТ нормалізувалася. Проте, незважаючи на успішну противірусну терапію, відмічено збільшення концентрації кріоглобулінів у сироватці крові на 70% і посилення синтезу антитіл до тиреоглобуліну (800 МО/мл, при першому обстеженні – 200).

У зв'язку з цим, хворій проведена внутрішньошкірна імунізація автолейкоцитами. При наступному обстеженні через 30 днів вміст кріоглобулінів у сироватці крові зменшився на 64,4 %; концентрація антитіл до тиреоглобуліну зменшилась до 500 МО/мл, до тиреопероксидази – до 580 МО/мл (при попередньому обстеженні ці показники складали 800 і 820 – зменшення на 37,50 і 29,27% відповідно). Противірусна терапія тривала. При обстеженні через 2 місяці після імунізації автолейкоцитами відмічено поліпшення стану хворої: ознаки кріоглобулінемії (в т.ч. і кріоглобулінемічного

васкуліту) зникли, проте відмічено збільшення концентрації антитіл до тиреопероксидази, яка досягла цього разу 2000 МО/мл (продукція антитіл до тиреоглобуліну децю зменшилася і складала 480 МО/мл).

Проведено повторну імунізацію автолейкоцитами. Вже через 10 днів після повторної імунізації кількість антитіл до тиреопероксидази зменшилася на половину – з 2000 до 1000 МО/мл, а вміст антитіл до тиреоглобуліну залишався на попередньому рівні (480 МО/мл). На цьому рівні показники автоімунного процесу зберігалися до закінчення противірусної терапії (наступні 6 місяців). При обстеженні через 4 місяці після закінчення терапії концентрація антитіл відрізнялася несуттєво (коливання в межах випадкових відхилень). Проведена ще одна імунізація, після якої титр антитіл до тиреопероксидази нормалізувався, а кількість антитіл до тиреоглобуліну стала лише трохи перевищувати норму (122 МО/мл, при референтному значенні до 115 нг/мл). Упродовж року (термін спостереження) ці показники коливалися несуттєво. Рівень гормонів щитовидної залози зберігався в межах норми.

Хвора С., 48 років. Діагноз: хронічний гепатит С, 1-й генотип HCV. Отримувала противірусну терапію ПЕГ-ІФН по 100 мкг 1 раз на тиждень і рибавірином по 1000 мг/доб. При обстеженні перед початком лікування виявлено збільшення титру антитіл до пероксидази щитовидної залози

(89 МО/мл, при референтному значенні до 34 МО/мл). При обстеженні через два місяці від початку терапії рівень антитіл до тиреопероксидази досяг 3000 МО/мл. У зв'язку з цим проведено імунізацію автолейкоцитами. Через 10 днів після імунізації рівень антитіл знизився до 1560 МО/мл. Через 35 днів зроблена повторна імунізація і досягнуто зменшення вмісту антитіл до 825 МО/мл. З незначними коливаннями рівень антитіл впродовж півроку знаходився в межах 800-900 МО/мл. Вміст гормонів в межах норми. На 8 місяці противірусної терапії рівень антитіл підвищився до 2000 МО/мл. Після чергової імунізації вміст антитіл знизився до 300 МО/мл і з незначними коливаннями (в межах 300-360 МО/мл) цей показник зберігався до закінчення противірусної терапії (48 тижнів).

З цих спостережень видно, що в результаті імунізації автолейкоцитами стало можливим стримати інтенсивність автоімунного процесу і провести противірусну терапію протягом 48 тижнів (термін, передбачений алгоритмом лікування хворих ХГС з 1-м генотипом HCV).

Висновок. Запропонований спосіб дозволяє знижувати активність автоімунного процесу стосовно антигенів щитовидної залози і, таким чином, зменшувати загрозу розвитку тиреоїдиту, у тому числі у хворих на ХГС під час противірусної інтерферонотерапії, що суттєво зменшує потребу у зменшенні дози або припиненні інтерферонотерапії.

Література

1. Никитин И.Г. Поражение щитовидной железы при противовирусной терапии хронических вирусных гепатитов // Гепатол. Форум – 2006. – №2. – С. 23–25.
2. Малый В.П. HCV-инфекция (острая и хроническая). – Киев, 2005. – 291 с.
3. Лопаткина Т.Н. Хронический гепатит С: внепеченочные проявления, особенности клинического течения, диагностика // Информационный бюллетень «Вирусные гепатиты». – 2000. – №2. – С. 5–6.
4. Федорченко С.В. Хроническая HCV-инфекция. – Киев. – ВСИ «Медицина», 2010. – 272 с.
5. Antonelli A., Ferri C., Pampana A., et al. Thyroid disorders in chronic hepatitis C. Am J Med. – 2004. – 117. – P. 10-13.
6. Akeno N., Blaskard J.T., Tomer Y. HCV E2 ptoein binds directly to thyroid cells and induces IL-8 production: a new mechanism for HCV induced thyroid autoimmunity // J. Autoimmun. – 2008. – N 31(4). – P. 339-344.
7. Боброва И.А. Современная противовирусная терапия больных гепатитом С с тиреоидными осложнениями // Гепатологія. – 2012. – № 3 (17). – С. 24–33.
8. Зінчук О.М. Ураження щитовидної залози у хворих на хронічний гепатит С на тлі протівірусної терапії: діагностика та лікування // Гепатологія. – 2013. - № 1 (19). – С. 18-25.
9. Балаян М.С., Михайлов М.И. Энциклопедический словарь – вирусные гепатиты. Русско-украинское издание. – Львов, ЛНМУ. – 2000. – 584 с.
10. Ferri C., LaCivita L., Fazzi P., et al. Interstitial lung fibrosis and rheumatic disorders in patients with hepatitis C virus infection. Br.J. Rheumatol., 1997. 36. 360-365.
11. Сочнев А.М., Алексеев Л.П., Тананов А.Т. Антигены системы HLA при различных заболеваниях и трансплантации. – Рига: Знание, 1987. – 168 с.
12. Tomer Y., Blackard J.T., Akeno N. Interferon alpha treatment and thyroid dysfunction // Endocrinol Metab Clin North Am. - 2007. – V. 36, N 4. - P.1051–1066
13. Дранник Г.И. Клиническая иммунология и аллергология. – Киев, 2010. – 552 с.
14. Герасун Б.А., Андрейчин М.А., Грицко Р.Ю., Ворожбит О.Б., Коpecь Р.А., Герасун О.Б. Застосування лейкоцитів у клітинній терапії // Гепатологія. – 2012. – № 2 (16). – С. 4-17.
15. Herasun B.A., Hrytsko R.Yu. Original treatment method of frequently recurrent chronic herpetic infection caused by herpes simplex virus I and II types // Central European Journal of Immunology – 2012. – Vol. 37. – No 4. – P. 362-364.
17. Golab J., Jakobisiak M. Lasek W., Stoklosa T. Immunologia. Warszawa, Wydawnictwo Naukowe PWN, 2007. – 511 s.