

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ВНУТРІШНЬОШКІРНОЇ ІМУНІЗАЦІЇ НЕІНАКТИВОВАНИМИ АВТОЛЕЙКОЦИТАМИ НА СТАН ПРОТИВІРУСНОГО ІМУНІТЕТУ В ХВОРИХ НА ХГВ

(Досліди у культурі лейкоцитів)

О.Б. Герасун

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

У статті наведені дані про вплив внутрішньошкірної імунізації неінактивованими автолейкоцитами на стан гіперчутливості сповільненого типу по відношенню до антигенів ВГВ. Дослідження проведено у культурах лейкоцитів, виготовлених з клітин венозної крові хворих на ХГВ. До культури лейкоцитів додавали стимулюючий антиген (HBsAg) на твердій фазі. Вплив антигена на феномен гіперчутливості сповільненого типу (ГЧСТ) оцінювали за синтезом лейкоцитами фактора некрозу пухлин альфа. Культуру лейкоцитів виготовляли із клітин крові, отриманих до і через 10 днів після імунізації хворих автолейкоцитами. Встановлено, що у хворих на ХГВ стан ГЧСТ до антигенів вірусу є, як правило, слабо вираженим, проте значно зростає після внутрішньошкірної імунізації автолейкоцитами. Оцінити ефективність імунітету у хворих по цих даних неможливо, доведено лише, що противірусний імунітет посилюється.

Ключові слова: хронічний гепатит В, HBsAg, внутрішньошкірна імунізація автолейкоцитами, культура лейкоцитів, гіперчутливість сповільненого типу до антигенів ВГВ.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ВНУТРИКОЖНОЙ ИММУНИЗАЦИИ НЕИНАКТИВИРОВАННЫМИ АУТОЛЕЙКОЦИТАМИ НА СОСТОЯНИЕ ПРОТИВОВИРУСНОГО ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ ХГВ

(Опыты в культуре лейкоцитов)

А.Б. Герасун

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

В статье описаны результаты изучения влияния внутрикожной иммунизации неинактивированными аутолейкоцитами на уровень гиперчувствительности замедленного типа (ГЧЗТ) по отношению к антигенам ВГВ. Исследования проводились в культуре лейкоцитов, изготовленных из клеток периферической

венозной крови больных ХГВ. В культуру лейкоцитов в качестве стимулятора сенсibilизированных клеток добавлялся HBsAg на твердой фазе. Влияние антигена на ГЧЗТ оценивали по интенсивности синтеза лейкоцитами фактора некроза опухоли альфа. Культуру лейкоцитов готовили из клеток, выделенных из крови до и через 10 дней после иммунизации пациентов аутолейкоцитами. Установлено, что у больных ХГВ уровень гиперчувствительности к антигенам вируса, как правило, слабо выраженный. Однако, он значительно возрастает после внутрикожной иммунизации аутолейкоцитами. Достоверно оценить эффективность иммунитета по этим данным нельзя, доказано лишь, что противовирусный иммунитет усиливается.

Ключевые слова: хронический гепатит В, HBsAg, внутрикожная иммунизация аутолейкоцитами, культура лейкоцитов, гиперчувствительность замедленного типа к антигенам ВГВ.

INVESTIGATION OF INFLUENCE OF INTRADERMAL IMMUNIZATION WITH INACTIVATED AUTOLEUKOCYTES ON THE CONDITION OF ANTIVIRAL IMMUNITY IN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS B
(Investigation in leukocyte culture)

O.B. Herasun

Danylo Halytsky Lviv national medical university, Lviv, Ukraine

Data about influence of autoleukocyte immunization with inactivated autoleukocytes on the condition of delayed-type hypersensitivity in relation to HBV antigens have been presented in the article. The investigation was conducted in leukocyte cultures, prepared from venous blood cells of patients with chronic hepatitis B. Stimulating antigen (HBsAg) on solid phase was added to leukocyte culture. Influence of antigen on delayed-type hypersensitivity phenomenon was evaluated by the leukocyte synthesis of tumor necrosis factor alpha. Leukocyte culture was prepared from blood cells, obtained before and in 10 days after immunization of patients with autoleukocytes. It has been established that delayed-type hypersensitivity phenomenon to virus, as a rule, is slightly evident in patients with chronic hepatitis B. However, it significantly increases after intradermal autoleukocyte immunization. It is impossible to evaluate the efficacy of immunity in patients only by these data. However, it is confirmed that antiviral immunity intensifies.

Key words: chronic hepatitis B, HBsAg, intradermal autoleukocyte immunization, leukocyte culture, delayed-type hypersensitivity to HBV antigens.

Вступ. Відомо, що складність лікування ХГВ зумовлена різноманітними можливостями HBV ухилятися від імунної відповіді. Особливе значення має здатність вірусу у формі провірусу протягом тривалого часу знаходитися в інфікованих клітинах: наявність зворотної транскриптази дозволяє вірусу вбудовувати власну ДНК у ДНК інфікованої клітини [1-3].

Хоча вірус гепатиту В переважно виявляють в гепатоцитах, проте встановлена здатність вірусу, хоч і до значно слабшої, репродукції в інших клітинах, зокрема в лімфоцитах. Лімфотропності вірусу надається важливе патогенетичне значення. За нашими даними, у хворих на ХГВ може виникати порушення імуноклітинної кооперації, через що сенсibilізовані лімфоцити не завжди забезпечують адекватну імунну відповідь. Це підтверджується у дослідях *in vitro*: гіперчутливість сповільненого типу (ГЧСТ) до HBsAg може не виявлятися в окремих хворих на ХГВ, незважаючи на наявність у них імунокомпетентних клітин, здатних до адаптивного перенесення сенсibilізації інтактним клітинам [4]. До того ж додавання до культури лейкоцитів, що отримані від хворих на ХГВ факторів переносу (трансфер фактор) не завжди впливало на сенсibilізацію лейкоцитів до антигена [4].

Саме тому метою нашого дослідження було встановити вплив на реакцію клітинного імунітету внутрішньошкірної імунізації неінертивними автолейкоцитами, оскільки цей метод ми розглядаємо як лікувальну

вакцину, що посилює протівірусну терапію аналогами нуклеоз(т)идів [5].

На даний час імунізація автолейкоцитами використовується у якості лікувальної вакцини для хронічного лабільного та генітального герпесу 1/2 типу в пацієнтів, які погано піддавалися протівірусній терапії [6] та випробовується і для лікування ВІЛ-інфекції [7]. При цьому головною метою використання автовакцини дослідники вважають можливість поновлення імунологічної функції власних клітин, які використовуються як донорські. Встановлено, що після зустрічі таких лімфоцитів із ефекторними клітинами, відбувається відновлення імунної реакції – амплітуда коливань, за даними авторів, залежить від особливостей поновлення імунітету [7].

Про стан протівірусного клітинного імунітету свідчить ГЧСТ до антигенів збудника в дослідях *in vitro* у культурі автолейкоцитів.

Відомим способом лабораторного дослідження сенсibilізації до антигена є реакція специфічної бласттрансформації лімфоцитів (БТЛ), тобто процесу, зумовленого наявністю у культурі лейкоцитів (КЛ) відповідного антигена [8]. Реакція ґрунтується на здатності лімфоцитів периферичної крові у культурі лейкоцитів під впливом антигена, до якого донор лейкоцитів сенсibilізований у процесі хвороби або вакцинації, перетворюватися у клітини попередники – бласти. Проте цей спосіб є складним і довготривалим (займає 6 –7 днів). До того ж, на показники сенсibilізації значною мірою впливає функціональний стан клітин, зокрема можли-

ве ушкодження (особливо при вірусних інфекціях) їх хромосомного апарата. Облік результатів досліджу є складним, а результат не завжди достовірним, оскільки проводиться за інтенсивністю синтезу ДНК або за підрахунком клітин, що ідентифіковані як бласти. Морфологічні зміни лімфоцита, які є заключним етапом складного процесу трансформації, не завжди завершуються утворенням бластної форми.

Саме тому ми розробили метод визначення сенсibiliзації організму до збудника хвороби по синтезу цитокінів у КЛ, стимульованої антигеном збудника на твердій фазі [8].

Перевага цього оригінального способу полягає у тому, що він враховує початкові етапи трансформації – активізацію внутрішньоклітинних біохімічних процесів, з яких починається специфічна БТЛ, а саме: синтез фактора некрозу пухлин α (ФНП- α) за його вмістом в супернатанті культивованих клітин. Синтез ФНП- α відбувається навіть у випадках незавершених морфологічних перетворень. Результати дослідження можна отримувати вже на 2–4 день культивування, тобто значно швидше, аніж за способом прототипу.

Саме тому для оцінки впливу внутрішньошкірної імунізації неіактивованими автолейкоцитами ми визначали інтенсивність синтезу ФНП- α у культурі автолейкоцитів, стимульованій HBsAg на твердій фазі.

Матеріали та методи.

Дослідження проводили в групі хворих на HBsAg-позитивний ХГВ. Хворих 12 (7 жінок і 5 чоловіків), віком від 22 до 65 років. У всіх хворих

фіброз за шкалою METAVIR не перевищував 2 ступеня. Інші вірусні гепатити та ВІЛ-інфекція не виявлені. Концентрація HBV DNA $\geq 20\ 000$ копій/мл, активність АлАТ у всіх хворих ≥ 2 верхні межі норми. Протівірусну терапію пацієнти ще не отримували.

Внутрішньошкірна імунізація автолейкоцитами хворих на ХГВ

1. Лейкоцити виділяли шляхом відстоювання гепаринізованої венозної крові. Для цього венозну кров в об'ємі 80-100 мл набирали у флакон з гепарином з розрахунку 50 од. гепарину на 10 мл крові та відстоювали при температурі 37°C 120-140 хвилин. Плазму крові відсмоктували та центрифугували при 450g протягом 7 хв. Осадок ресуспендували в 1-1,5 мл власної сироватки крові та вводили внутрішньошкірно по 0,1 мл у 8–12 точок у ділянку спини (до утворення «лимонної кірочки») [5].

Виготовлення культури лейкоцитів.

Лейкоцитарну масу виділяли з гепаринізованої венозної крові (4000 од на 20 мл крові) шляхом відстоювання у силіконових пробірках під кутом 45° при температурі 37°C протягом 60–80 хв. (при сповільненій ШОЕ в окремих випадках попередньо проводили центрифугування при 100 g протягом 3-х хв.). Лейкоцитарну масу обережно відсмоктували і двічі відмивали у п'ятикратному об'ємі середовища № 199, центрифугуючи при 400 g протягом 5 хв. Осад ресуспензували у середовищі № 199 до кінцевої концентрації 4–5 $\times 10^6$ клітин на 1 мл середовища. До культурального середовища

додавали пеніцилін та стрептоміцин по 100 од/мл.

Культуральне середовище з лейкоцитами перенесли у флакони, до яких додавали HBsAg на твердій фазі. Попередньо його тричі відмивали 0,9 % розчином NaCl по 40 с. Культивування проводили в атмосфері CO₂ при 37°С протягом 72 годин. Для забезпечення нормального газообміну об'єм газу перевищував об'єм середовища у 8–10 разів.

Після культивування клітини осаджували центрифугуванням та визначали вміст ФНП-α у супернатанті КЛ методом ІФА. Вміст ФНП-α визначали двічі: у КЛ, виготовленої із клітин, отриманих із крові пацієнта до імунізації та через 10-12 днів після імунізації автолейкоцитами.

Для визначення ФНП-α використовували тест-систему «Альфа-ФНО-ІФА-Бест», виробник Вектор Бест, Росія. Набір призначений для кількісного визначення людського ФНП-α у біологічній рідині організму та у культуральному середовищі. Дослідження проводили відповідно до інструкції виробника тест-системи.

В якості контролю використовували культуру лейкоцитів, виготовлену з крові донорів, в яких не було маркерів гепатиту В, зокрема anti-HBc та anti-HBs, тобто вони не хворіли на гепатит і відповідно є адекватними до антигенів ВГВ.

Результати та їх обговорення.

Імунізація автолейкоцитами у групі із 12 хворих на ХГВ призвела до посилення ГЧСТ по відношенню до HBsAg у всіх проімунізованих пацієнтів. Про це свідчить зростання вмісту ФНП-α у супернатанті КЛ, виготовленої із клітин, отриманих від пацієнтів через 10-12 днів після внутрішньошкірної імунізації автолейкоцитами (табл. 1).

З наведених даних у табл. 1 видно значне зростання синтезу цитокіну у хворих на ХГВ (>200 пг/мл), в т.ч. і в пацієнтів з цієї групи, в яких до імунізації ГЧСТ до HBsAg була практично відсутньою (показник сенсibiliзації – синтез ФНП-α у КЛ від 0 до 10 пг/мл). Аналогічні дані були отримані в інших КЛ, виготовлених із клітин, отриманих після імунізації хворих на ХГВ.

Таблиця 1.

Вплив імунізації автолейкоцитами на стан клітинного противірусного імунітету хворого на ХГВ (по інтенсивності синтезу ФНП-α).

до імунізації пацієнта (пг/мл)*	Вміст ФНП-α у КЛ, виготовленої із клітин, отриманих через 10-12 днів після імунізації (пг/мл)				Загальна кількість хворих
	150-200	201-300	301-400	>400	
До 10 пг/мл		2	1	1	4
11-30	-	3	2	1	6
31-40		1		1	2

*У культурі лейкоцитів, виготовленої з клітин, отриманих від донорів, які не хворіли на гепатит В, наявність HBsAg не викликала стан ГЧЗТ (стимуляція цитокіну не відбувалась).

У контрольних дослідженнях, тобто у КЛ, виготовлених із клітин крові донорів, що не хворіли на гепатит В та не були вакциновані проти гепатиту В, лейкоцити на антиген вірусу не реагували – синтез цитокіну не відбувався.

Зрозуміло, що результати, отримані в досліді *in vitro*, не можуть повністю відповідати стану імунної системи організму, проте збільшення реакції клітин на HBsAg у культурі лейкоцитів, без сумніву, свідчать про посилення клітинного імунітету.

Таким чином, можна вважати доведеним, що внутрішньошкірна імунізація хворих на ХГВ неінактивованими автолейкоцитами посилює ГЧСТ, тобто позитивно впливає на стан імунної системи по відношенню до антигенів збудника хвороби.

Висновки.

Зрозуміло, що вірогідно оцінити вплив внутрішньошкірної імунізації неінактивованими автолейкоцитами на інтенсивність імунної системи (відносно ВГВ) по цих даних неможливо, можна лише зробити висновок про її посилення. Проте, з отриманих результатів видно, що імунізацію автолейкоцитами, які містять в собі компоненти вірусу, можна розглядати як лікувальну вакцину. Детальну ефективність її треба вивчати, аналізуючи вплив на рівень вірусного навантаження у хворих на ХГВ.

Результати, отримані в досліді у КЛ, вказують на доцільність подальшого вивчення ефективності імунізації автолейкоцитами, тим паче, що така імунізація зменшує інтенсивність аутоімунних позапечінкових проявів хронічного гепатиту та не має протипоказів [9, 10].

Література

1. Жданов В.М., Ананьев В.А., Стаханова В.М. Вирусные гепатиты. – Москва: Медицина. 1986. – 256 с.
2. Михайлов М.И., Мамедов М.К. Вирусные гепатиты В и С у онкологических больных. – Москва: ВК., 2012. – 228 с.
3. Кюрегян К.К., Михайлов М.И. Молекулярно-биологические аспекты контроля вирусных гепатитов. – Москва: Издательство Икар, 2013. – 336 с.
4. Герасун О.Б. Особливості специфічної імунної відповіді у хворих на хронічний гепатит В // Гепатологія – 2013. – № 1. – С. 23–34.
5. Герасун О.Б. Перший досвід використання внутрішньошкірної імунізації неінактивованими автолейкоцитами як лікувальної вакцини хронічного гепатиту В // Гепатологія. – 2015. – № 3 – С. 30–40.
6. Herasun B.A., Hrytsko R.Yu. Original treatment method of frequently recurrent chronic herpetic infection caused by herpes simple virus I and II types // Central European Journal of Immunology – 2012. – Vol. 37, N 4.
7. Ho M., Armstrong J., McMahon D., Pazin G., Huang X.L., Rinaldo C., Whiteside T., Tripoli C., Levine G., Moody D., et al. A phase 1 study of adoptive transfer of autologous CD8+ T lymphocytes in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)-related complex or AIDS // Blood. – 1993. – Vol. 81. – P. 2093-2101.
8. Герасун О.Б., Задорожний А.М., Зінчук О.М. Спосіб визначення сенсibilізації організму при інфекційних хворобах – Патент на корисну модель № 26600, 25.09.07.

9. Герасун Б.А., Андрейчин М.А., Ворожбит О.Б. і співав. Застосування лейкоцитів у клітинній терапії // Гепатологія, 2012. – №2 (16). – С. 4-17.

10. 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.