

ПЕРСОНІФІКОВАНИЙ МЕТОД ПОСИЛЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ПРОТИВІРУСНОЇ ТЕРАПІЇ ХРОНІЧНОГО ГЕПАТИТУ В

О.Б. Герасун

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

Зв'язок з автором: Герасун Олександр Борисович, к. мед. н., доцент кафедри інфекційних хвороб ЛНМУ; тел. : 0667351706; e-mail: fnk@rambler.ua

У статті розглядається оригінальний метод посилення ефективності противірусної терапії хронічного гепатиту В. Для цього на тлі противірусної терапії препаратом з групи аналогів нуклеоз(т)идів внутрішньошкірно проводили імунізацію нативними автолейкоцитами, яку можна розглядати як один з видів персоніфікованої терапії. Вакцинували пацієнтів, які отримували противірусну терапію понад 2 роки, при умові, що в них, після досягнення індивідуального позитивного результату лікування, подальше зменшення вірусного навантаження припинялось. Проводили потрібну вакцинацію автолейкоцитами з інтервалом у 30-40 днів. Для виготовлення вакцини 80-100 мл гепаринізованої венозної крові пацієнта відстоювали при температурі 37 °С протягом 120-140 хвилин, після чого виділену плазму центрифугували при 450g протягом 8 хвилин. До осаду лейкоцитів додавали 1-1,5 мл сироватки крові пацієнта та клітини вводили внутрішньошкірно по 0,1 мл в 10-15 точок в ділянці спини. У всіх пацієнтів вже після одноразової імунізації поновлювався процес подальшого зменшення вірусного навантаження, проте досягнути від'ємного результату суперчутливого методу PCR вдалося лише у 20% хворих.

Ключові слова: хронічний гепатит В, противірусна терапія, вакцинація автолейкоцитами.

ПЕРСОНИФИЦИРОВАННЫЙ МЕТОД УСИЛЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОТИВОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКОГО ГЕПАТИТА В

А.Б. Герасун

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

В статье рассматривается оригинальный метод усиления эффективности противовирусной терапии хронического гепатита В. Для этого на фоне противовирусной терапии препаратом с группы аналогов нуклеот(з)идов проводи-

ли внутрикожную иммунизацию нативными аутолейкоцитами, рассматриваемую как один из видов персонифицированной терапии. Вакцинировали пациентов, получавших противовирусную терапию более 2 лет, при условии, что у них, после достижения индивидуального положительного результата, дальнейшее уменьшение вирусной нагрузки прекращалось. Проводили трехразовую вакцинацию аутолейкоцитами с интервалом в 30-40 дней. Для приготовления вакцины 80-100 мл гепаринизированной венозной крови пациента отстаивали при температуре 37° С в течение 120-140 мин, после чего выделенную плазму крови центрифугировали при 450g в течение 8 минут. К осадку добавляли 1-1,5 мл сыворотки крови и лейкоциты вводили внутрикожно по 0,1 мл в 10-15 точек в области спины. У всех пациентов уже после одноразовой иммунизации восстанавливался процесс дальнейшего уменьшения вирусной нагрузки, однако добиться отрицательного результата ультрачувствительного метода PCR удалось у 20% больных.

Ключевые слова: хронический гепатит В, противовирусная терапия, вакцинация аутолейкоцитами.

PERSONIFIED METHOD OF AMPLIFICATION OF ANTIVIRAL THERAPY EFFICACY IN CHRONIC HEPATITIS B

O.B. Herasun

Danylo Halytsky Lviv national medical university, Lviv, Ukraine

The article highlights an original method of amplification of antiviral therapy efficacy in chronic hepatitis B. Thus, along with antiviral therapy with medicines from nucleoside group analogues, immunization with native autoleukocytes was performed intradermally. It can be considered as one of the kinds of personified therapy. Patients, who had received antiviral therapy over two years, were vaccinated, if after achievement of individual positive result of treatment, further reduction of viral load ceased. Triple vaccination with autoleukocytes was conducted with an interval of 30-40 days. To receive the vaccine, 80-100 ml of a patient's heparinized venous blood was being settled at t 37°C for 120-140 minutes, then, isolated plasma was being centrifuged at 450 g for 8 minutes. Further, 1-1.5 ml of patient's blood serum was added to leukocyte suspension and the cells were injected intradermally in the dose 0.1 ml into 10-15 points in the back. The process of further reduction of viral load was restored in all patients already after single immunization; however, negative result of highly sensitive PCR method could be achieved only in 20% of patients.

Key words: chronic hepatitis B, antiviral therapy, vaccination with autoleukocytes.

ВСТУП. Відомо, що складність лікування хронічного гепатиту В (ХГВ) зумовлена різноманітними можливостями вірусу гепатиту В (HBV) ухилятися від імунної відповіді та противірусної терапії. Здатність HBV до мутацій та особливо – інтеграція DNA HBV у геном гепатоциту дозволяють вірусу зберігатися в умовах противірусної терапії [1-3].

Через недостатню ефективність противірусної терапії ХГВ протягом тривалого часу розробляються різні лікувальні вакцини [4, 5]. Проте абсолютна більшість цих вакцин випробується лише в експериментах, переважно на тваринах. До випробуваних у клінічних умовах належать вакцини, які широко використовуються для імунізації населення з метою профілактики вірусного гепатиту В. Переважно це рекомбінантні дріжджові вакцини, що містять продукт S-гена ВГВ (білок HBsAg). Комерційні вакцини майже не мають протипоказів і тому їх можна випробувати як лікувальну вакцину [6]. Проте такі вакцини посилюють імунітет лише по відношенню до HBsAg, що недостатньо для ефективної вірусної інактивації та може призводити до мутацій в «а»-детермінанті HBsAg (у науковій літературі ці мутації розглядаються як «втеча» вірусу від імунної відповіді).

Тому метою нашого дослідження було випробування в якості лікувальної вакцини внутрішньошкірної імунізації неінактивованими автолейкоцитами. Відомо, що імунізація автолейкоцитами переважно використовується для лікування різних авто-

імунних процесів [7, 8], зокрема тих, що розглядаються як позапечінкові прояви вірусних гепатитів [9-11]. До того ж, автолейкоцити при ряді вірусних інфекцій можна використовувати як вірусомісний матеріал. Так, внутрішньошкірна імунізація неінактивованими автолейкоцитами виявилась ефективною для лікування часто рецидивуючого герпесу, викликаного вірусом 1 та 2 типу [12]. Імунізація автолейкоцитами випробується і для лікування ВІЛ-інфекції [13].

Широкий спектр імунізації автолейкоцитами створює підстави для випробування цього методу для лікування хворих на ХГВ. До того ж автолімфоцити можна використовувати як суто індивідуальний вірусомісний матеріал («персоніфікована терапія»), що є особливо важливим для лікування ХГВ і якісно відрізняє цей метод від інших лікувальних вакцин.

Імунізацію автолейкоцитами випробували для посилення противірусної терапії аналогом нуклеоз(т)иду. В якості препарату з цієї групи обрано тенофовір.

Матеріал та методи. Проімунізовано 55 хворих на ХГВ віком від 22 до 63 років (30 жінок та 25 чоловіків), в яких не було цирозу печінки, інших вірусних гепатитів та ВІЛ-інфекції. До дослідження увійшли ті, в кого, незважаючи на тривалу терапію тенофовіром (не менше 2-х років), продовжувалась реплікація DNA HBV. До того ж у цих відібраних пацієнтів, після досягнення максимального індивідуального ефекту противірусної терапії, зменшення вірусного навантаження у подальшому

припинялось, щонайменше протягом 8-місячного спостереження суттєвих змін рівня вірусного навантаження вже не було. Для подальшого посилення ефективності противірусної терапії пацієнтів внутрішньошкірно імунізували неінактивованими автолейкоцитами. Імунізацію проводили тричі з інтервалом у 30-40 днів, в окремих випадках багаторазово.

Пацієнти були поділені на три групи, залежно від вірусного навантаження, яке спостерігалось в наслідок тривалого лікування. У першій групі із 16 хворих (29,1% від загальної кількості) вміст DNA HBV на час імунізації автолейкоцитами становив від 3×10^4 до $\geq 1 \times 10^8$ МО/мл; в 25 пацієнтів другої групи (45,45%) – вірусне навантаження було менше 2×10^3 МО/мл; у 14 пацієнтів (25,45%) третьої групи DNA HBV вдалося виявити лише якісним методом PCR (аналітична чутливість 5 МО/мл).

У 46 пацієнтів генотип вірусу D (83,64%), в 9 – A (16,36%).

Імунізація автолейкоцитами.

Лейкоцити виділяли шляхом відстоювання гепаринізованої венозної крові. Для цього венозну кров в об'ємі 80-100 мл набирали у флакон з Heparinum patricum (Heparini-Richter) з розрахунку 50 од. гепарину на 10 мл крові і відстоювали при температурі 37°C 120-140 хвилин. Плазму крові відбирали та центрифугували при 450g протягом 8 хв. Осад ресуспендували в 1-1,5 мл сироватки крові пацієнта.

Імунізацію автолейкоцитами периферичної крові проводили наступним чином: лейкоцити вводили вну-

трішньошкірно (до утворення «лимонної кірочки») по 0,1 мл у 10–15 точок в шкіру спини.

Вірусне навантаження та кількість HBsAg визначали перед імунізацією та через 30-35 днів після неї. DNA HBV визначали кількісним або, при потребі, якісним методом PCR (чутливість – 5 МО/мл).

Цироз печінки виключали на підставі даних клініко-біохімічного обстеження та визначення ступеня фіброзу печінки методом Фібро Тесту (44 пацієнти) або шляхом патогістологічного дослідження біоптату печінкової тканини (11 пацієнтів).

Для кількісного визначення HBV DNA методом PCR використовували тест-систему «Corbett Research» (Австралія). Гепатит С в пацієнтів, що увійшли до групи дослідження, виключали визначенням HCV RNA якісним методом PCR (Real-time), використовуючи тест-систему «Corbett Research» (Австралія); на ВІЛ-інфекцію пацієнтів обстежували методом ELISA за допомогою тест-системи четвертого покоління Genscreen Ultra HIV Ag–Ab (Bio-Rad, France).

Результати та їх обговорення. Результати імунізації автолейкоцитами, які проводили на тлі противірусної терапії, представлені у табл. 1.

Проаналізуємо результати лікування в групах пацієнтів.

Перша група. Потрійна імунізація автолейкоцитами у групі із 16 хворих на ХГВ, в яких вміст DNA HBV становив до імунізації на тлі противірусної терапії $\geq 3 \times 10^4$ МО/мл, призвела до значного зменшення інтенсивності реплі-

Вплив імунізації автолейкоцитами на інтенсивність реплікації HBV DNA

Вміст HBV DNA перед імунізацією (МО/мл)	Кількість хворих	Вміст після імунізації (МО/мл)			Ефективність у підгрупі
		< 1 000	5	0	
від 3×10^4 до $\geq 1 \times 10^8$	16	11*(68,75%)	5 (31,25%)	-	100%
< 2×10^3	25	-	19 (76%)	6 (24%)	100%
Виявлявся лише ультрачутливим методом PCR	14	-	9(64,29%)	5 (35,71%)	35,71%

* В одному випадку відбулось загострення

кації DNA HBV у всіх пацієнтів. Так, в 11-и пацієнтів з першої підгрупи після імунізації кількісне визначення вмісту DNA HBV стало меншим 1000 МО/мл (68,75%) (в 7 з них протягом року подальшого спостереження він коливався в межах від 160 до 300 МО/мл); в 5-х – виявлення HBV DNA стало можливим лише за допомогою ультрачутливого методу PCR (31,25%). Отже, позитивна ефективність лікування зареєстрована у всіх пацієнтів групи (100%) проте, на жаль, DNA HBV продовжувала виявлятися (негативного результату ультрачутливого методу PCR досягти не вдалось).

В однієї хворої з цієї підгрупи, незважаючи на трьохрічну противірусну терапію тенофовіром, вміст HBV DNA становив понад 1×10^8 МО/мл. Вже через 30 днів після першої імунізації вміст DNA HBV зменшився до $2,1 \times 10^3$ МО/мл, а після 3-ої – становив 420 МО/мл. Отже, пригнічення реплікації вірусу відбувалося швидко та інтенсивно, натомість кількість HBsAg в сироватці крові майже не змінилася. Імунізацію та лікування хворої тенофовіром припинили, бажаючи прослідкувати за стійкістю досягнутого результа-

ту, що зараз розцінюємо як помилкове рішення. На це вказує те, що при обстеженні через чотири місяці концентрація HBV DNA піднялась до попереднього рівня: стала більше 1×10^8 МО/мл.

У зв'язку з поновленням інтенсивної вірусної реплікації знову почали імунізацію на тлі лікування тенофовіром – концентрація вірусу почала зменшуватись, проте значно повільніше. Багаторазову імунізацію проводили з інтервалом в один місяць і перед кожною визначали вірусне навантаження. Після першої вакцинації через 30 днів вірусне навантаження становило $4,4 \times 10^7$ МО/мл; після 6-ї – $1,5 \times 10^4$ МО/мл, а після 7-ої – 11 МО/мл.

Отже, вплив повторного процесу імунізації на рівень реплікації HBV значно послабшав, порівняно із попереднім. Створюється враження, що передчасне припинення терапії сприяло розвитку мутації вірусу і призвело до послаблення ефективності вакцинації.

Друга група пацієнтів. З 25 пацієнтів, в яких вміст DNA HBV був < 2×10^3 МО/мл, у 19 після трьохразової імунізації автолейкоцитами вірусне навантаження стало визначатися лише ультрачутливим методом PCR

(76%), а в 6 хворих DNA HBV протягом року (термін спостереження) взагалі перестало виявлятися (24%).

Третя група пацієнтів. З 14 хворих, в яких внаслідок тривалої противірусної терапії виявити наявність HBV DNA вдалося лише ультрачутливим методом PCR, в 5-х після трьохразової імунізації вірус перестав виявлятися (35,71%). Іншим хворим для припинення реплікації вірусу додатково зробили ще 3-4 імунізації на тлі противірусної терапії, проте результат ультрачутливого методу PCR залишався позитивним.

Що стосується HBsAg, то він перестав визначатися в 9 пацієнтів із 11, у яких вдалося досягти негативного результату ультрачутливого методу PCR (81,82%); в інших пацієнтів, незважаючи на значне зниження вірусного навантаження, вміст HBsAg зменшувався помірно.

Отже, імунізація автолейкоцитами на тлі противірусної терапії посилює ефективність лікування. Вірусне навантаження значно зменшується, хоча ступінь реагування носить суто індивідуальний характер. Проте припинити реплікацію HBV DNA, по даних ультрачутливого методу PCR, із 55 цих хворих, вдалося лише в 11 пацієнтів (20%). Протягом року (період спостереження) досягнуті результати зберегалися, проте на тлі противірусної терапії тенофовіром. Зрозуміло, що ці показники стосуються пацієнтів, більшість з яких недостатньо реагувала на противірусну терапію. Достатньо нагадати, що в 16 пацієнтів (з 55; 29,09%), незважаючи на тривалу противірусну

терапію, вміст HBV DNA у крові становив від 3×10^4 до $\geq 1 \times 10^8$.

Механізм дії внутрішньошкірної імунізації неінактивованими автолейкоцитами вивчений недостатньо, проте його можна розглядати як комплексний вплив автореактивних клітин на механізми імунної відповіді. Вплив імунізації автолейкоцитами на стан автоімунних процесів пояснюють наявністю в лімфоцитах фактора переносу, що робить таку імунізацію подібною до вакцинації для профілактики інфекційних хвороб [7]. Проте лімфоцити, в яких відбувається реплікація DNA HBV, одночасно є і природним «вірусомісним матеріалом».

У разі внутрішньошкірного введення автореактивні клітини можуть викликати стан активності клітинної лімфоцитарно-опосередкованої імунної відповіді шляхом генерування цитотоксичних лейкоцитів. Важливим є і процес корекції сітки Ерне – ідіотип-антиідіотипова регуляція імунної відповіді, активація CD3+, CD8+, CD25+-лімфоцитів, а також CD3+, CD8+, CD28+-лімфоцитів, одночасно із блокуванням Fc-рецепторів та глікопротеїнових, лектинових рецепторів на В-лімфоцитах [7, 8].

Отже, імунізація вірусомісними лімфоцитами не тільки може посилювати противірусний імунітет [12], але й одночасно зменшує синтез криоглобулінів та пригнічує інші автоімунні процеси [9-11], що теоретично також може впливати на ефективність противірусної терапії. До того ж імунізація автолейкоцитами значно пригнічує продукцію прозапального цитокіну – фактора некрозу пухлин-альфа [14].

Виділення лімфоцитів шляхом попереднього відстоювання крові призводить до потрапляння до маси лейкоцитів інших клітин – еритроцитів. У даному випадку, на нашу думку, їх можна порівняти з хімічними ад'ювантами, що посилюють дію вакцини за рахунок затримки «видалення» антигена, тим паче, що, як відомо, в еритроцитах хворих на ХГВ наявні вірус та окремі його антигени.

За даними, отриманими в попередніх дослідях *in vitro*, встановлено, що імунізація автолейкоцитами посилює клітинний протівірусний імунітет. Про це свідчить те, що у культурі лейкоцитів, виготовленої з клітин, отриманих із периферичної крові хворих на ХГВ через 10-12 днів після імунізації, гіперчутливість сповільненого ти-

пу до HBsAg є значно інтенсивнішою, ніж у культурі автолейкоцитів, виготовленої до імунізації [15].

Вплив генотипу вірусу на ефективність імунізації встановити не вдалось. Це зумовлено значним переваженням генотипу D у досліджуваній групі, що обумовлено природним розподілом.

Висновки. У хворих на ХГВ внутрішньошкірна імунізація неінактивованими автолейкоцитами суттєво впливає на інтенсивність протівірусної терапії гепатиту. Про це свідчить поновлене зменшення вмісту HBV DNA у хворих, в яких дія протівірусної терапії до імунізації призупинилася. Особливо це помітно у хворих із високим вірусним навантаженням.

Література

1. Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection – natural history and clinical consequences // *N. Engl. J. Med.*- 2004.- 11.- P. 1118-1129.
2. Brechot C Pathogenesis of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: old and new paradigms// *Gastroenterology*-2004.- 5.- 56-61.
3. Luo K, Hou J, Wang Z et al. Prevalence of naturally occurring surface gene variants of hepatic B virus in nonimmunized surface antigenegative Chinese carriers // *Hepatology*.- 2001.- 5.- 1027-1034.
4. Kosinska A.D., Zhang E., Lu M., Roggendorf M. Hepatitis Research and Treatment. – Volume 2010, Article ID 817580, 17 pages.
5. Michel M.-L., Deng Q., Mancini-Bourguine M. Therapeutic vaccines and immune-based therapies for the treatment of chronic hepatitis B: Perspectives and challenges. Published Online: January 14, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2010.12.031>
6. Патент RU 2166961. Спосіб лікування вірусного гепатиту В / Борисова В.Н., Мельников В.А., Пригулина Ю.Г., Рычнев В.Е., Земсков А.М., Саломохин Г.Г., Буданов М.В., Яковлева И.М.
7. Якобісяк М. Імунологія / Переклад з польської за редакцією В.В. Чоп'як.-Вінниця: НОВА КНИГА, 2004.- 672 с.
8. Golab J, Jakobisiak M, Lasek W, Stoklosa T./ *Immunologia*.-2007. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
9. Герасун Б.А., Андрейчин М.А., О.Б. Ворожбит та ін. Застосування лейкоцитів у клітинній терапії // *Гепатологія*.- 2012.-2.- С. 4–17.
10. Holubovska OA, Shkurba AV, Herasun OB, Vorozhbyt OV, Kopets RA, Hrytsko RY, Herasun BA. Intradermal Autoleukocyte Immunization-Personified Method of Cell Therapy // *Journal of Immunology and Vaccination*.- 2016;1.- 1-5.

11. Gerasun BA, Holubovska OA, Hrytsko RY, Zinchuk ON, Shkurba AV // 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, 8(2): 140-145.
12. Herasun BA, Hrytsko Ru. Original treatment methods of frequently recurrent chronic herpetic infection caused by herpes virus type I and type II. *Central European Journal of Immunology* 2012; 37 (4): 362-364.
13. Ho M, Armstrong J, McMahon D, Pazin G, Huang XL, Rinaldo C, Whiteside T, Tripoli C, Levine G, Moody D et al. (1993) A phase 1 study of adoptive transfer of autologous CD8+ T lymphocytes in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)-related complex or AID: *Blood* 81: 2093-2101.
14. Gerasun B.A. New Method of Inhibition of Activity of Tumor Necrosis Factor Alpha In Patients with Psoriasis. *Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery* 2016, 10, 8-13
15. Герасун О.Б. Особливості специфічної імунної відповіді у хворих на хронічний гепатит В // *Гепатологія*.- 2013.- 1.- С. 23–34.