



Динамика фактора некроза опухоли-альфа при лечении больных рассеянным склерозом методом трансиммунизации

Кильдюшевский А.В.¹ • Котов С.В.¹ • Сидорова О.П.¹ • Бородин А.В.¹

Кильдюшевский Александр Вадимович – д-р мед. наук, профессор, вед. науч. сотр. отделения хирургической гемокоррекции и детоксикации¹

Котов Сергей Викторович – д-р мед. наук, профессор, руководитель неврологического отделения, заведующий кафедрой неврологии факультета усовершенствования врачей¹

✉ 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2–10, Российская Федерация.
Тел.: +7 (495) 631 73 62.
E-mail: kotovsv@yandex.ru

Сидорова Ольга Петровна – д-р мед. наук, вед. науч. сотр. неврологического отделения, профессор кафедры неврологии факультета усовершенствования врачей¹

Бородин Александр Валерьевич – врач неврологического отделения¹

Актуальность. Несмотря на то что существует большое число методов лечения рассеянного склероза с различными точками приложения, лечение не всегда эффективно. По данным литературы, в эксперименте отмечено значительное снижение уровня фактора некроза опухоли-альфа (ФНО- α) при использовании экстракорпоральной фотохимиотерапии. **Цель** – определить динамику ФНО- α у больных рассеянным склерозом на фоне лечения методом трансиммунизации. **Материал и методы.** Обследованы 13 взрослых больных рассеянным склерозом. ФНО- α определяли в сыворотке крови с помощью хемилюминесцентного иммуноанализа на приборе IMMULITE 1000 с использованием реактива Siemens. Для лечения больных применяли трансиммунизацию – модифицированную методику фотофереза. За 2 часа до процедуры пациенты принимали внутрь Аммифурин (8-метоксипсорален), затем на клеточном сепараторе Haemonetics MCS+ по протоколу PBSC проводили выделение мононуклеарных клеток. Далее мононуклеары подвергали ультрафиолетовому облучению в течение 90 минут и инкубации в течение 20 часов при температуре 37 °С. На

следующий день клетки реинфузировали больному. Процедуру проводили 2 раза в неделю ежемесячно на протяжении 6 месяцев, затем 1 раз в 4 месяца. **Результаты.** До проведения трансиммунизации среднее значение ФНО- α у взрослых больных рассеянным склерозом составило $9,958 \pm 0,812$ пг/мл при норме менее 8,1 пг/мл, после проведения трансиммунизации – $6,992 \pm 0,367$ пг/мл ($p < 0,05$). **Заключение.** При проведении ультрафиолетового облучения моноцитов периферической крови с их последующей инкубацией (трансиммунизация) отмечалось 30% снижение уровня ФНО- α в сыворотке крови у больных рассеянным склерозом, что свидетельствует о супрессивном воздействии трансиммунизации на ФНО- α . Следовательно, у больных рассеянным склерозом трансиммунизация оказывает противовоспалительное действие.

Ключевые слова: рассеянный склероз, трансиммунизация, фотоферез, экстракорпоральная фотохимиотерапия

doi: 10.18786/2072-0505-2016-44-3-324-328

¹ ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»; 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация



В основе патогенеза рассеянного склероза лежат иммунологические нарушения, приводящие к усилению гибели нейронов. Одним из механизмов этого процесса выступает нарушение синтеза регуляторных факторов апоптоза провоспалительных цитокинов – фактора некроза опухоли-альфа (ФНО- α), гамма-интерферона.

ФНО- α считается основным проапоптогенным цитокином, который приводит к индукции апоптоза клеток крови. Он синтезируется макрофагами при их активации во время различных заболеваний, соответственно, в сыворотке крови здоровых людей не определяется. Этот цитокин также вырабатывается в Т-клетках периферической крови человека, когда они активируются с помощью рецепторов CD2 или CD3 в присутствии интерлейкина-2 [1]. ФНО- α вызывает такие процессы, как индуцирование апоптоза, антиапоптоз, антибактериальный и противовирусный защитный ответ, регуляция секреции иммуноглобулинов, адгезия лейкоцитов, регуляция клеточной пролиферации и др. Он играет важную роль в развитии воспалительной реакции и иммунного ответа. Показано, что Т-лимфоциты (CD4⁺), выделенные из спинномозговой жидкости пациентов с рассеянным склерозом, после стимуляции фитогемагглютинином начинают вырабатывать большое количество ФНО- α , гамма-интерферона, интерлейкина-2 [2]. Кроме того, повышенные количества ФНО- α вырабатывают моноциты, выделенные из крови больных рассеянным склерозом [3].

Концентрацию ФНО- α связывают с клинической активностью рассеянного склероза [4]. С.А. Вострякова и соавт. [5] показали, что при обострении рассеянного склероза повышается уровень ФНО- α . В группе пациентов ($n=32$) в стадии ремиссии показатели концентрации ФНО- α были в пределах нормы (от 0 до 50 пг/мл) независимо от получаемой терапии, а у пациентов в стадии обострения заболевания и с более выраженным неврологическим дефицитом ($n=4$) среднее значение концентрации ФНО- α составило $768,5 \pm 313$ пг/мл до лечения и 810 ± 265 пг/мл через 3 месяца после терапии глатирамера ацетатом. Согласно данным D. Obradović и соавт. [6], при рецидиве рассеянного склероза (34 пациента) наблюдается повышение уровня ФНО- α в спинномозговой жидкости по сравнению с пациентами в стадии ремиссии ($n=14$, $p < 0,001$).

Однако есть информация, что в случае подавления ФНО- α у больных ревматоидным артритом возможно развитие рассеянного склероза

[7]. В ряде публикаций [8–10] отмечено развитие демиелинизации центральной нервной системы у больных, получающих терапию анти-ФНО-препаратами.

G. Cavaletti и соавт. [11] сообщили о значительном снижении уровня ФНО- α у крыс при использовании экстракорпоральной фотохимиотерапии. Исследователи заключили: экстракорпоральная фотохимиотерапия изменяет активность мононуклеаров периферической крови. Было также высказано предположение, что снижение активности Т-хелперов в лимфоцитах представляет собой один из противовоспалительных механизмов экстракорпоральной фотохимиотерапии. Позднее начали применять метод трансиммунизации – проведение экстракорпоральной фотохимиотерапии с последующей 20-часовой инкубацией моноцитов периферической крови [12].

Цель исследования – определить динамику ФНО- α у больных рассеянным склерозом на фоне лечения методом трансиммунизации.

Материал и методы

Обследованы 13 взрослых больных рассеянным склерозом, госпитализированных в неврологическое отделение ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского в 2013–2014 гг. Диагноз рассеянного склероза устанавливали на основании течения болезни, наличия неврологической симптоматики, изменений магнитно-резонансной томограммы головного мозга с характерным распространением патологического процесса в пространстве и во времени. У всех больных было ремитирующее течение заболевания. Проведение исследования было одобрено независимым комитетом по этике при ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского. Участники исследования подписывали добровольное информированное согласие на обследование и лечение.

Для лечения больных применяли трансиммунизацию – модифицированную методику фотофереза. За 2 часа до процедуры пациенты принимали внутрь Аммифурин (8-метоксипсорален), затем на клеточном сепараторе Haemonetics MCS+ по протоколу PBSC проводили выделение мононуклеарных клеток. Далее мононуклеары подвергали ультрафиолетовому облучению в течение 90 минут и инкубации в течение 20 часов при температуре 37 °С. На следующий день клетки реинфузировали больному. Процедуру проводили 2 раза в неделю ежемесячно на протяжении 6 месяцев, затем лечение повторяли 1 раз в 4 месяца. Оценивали влияние трансиммунизации на уровень ФНО- α в сыворотке крови. ФНО- α в сыворотке крови

определяли до и после проведения трансиммунизации с помощью хемилюминесцентного иммуноанализа на приборе IMMULITE 1000 с использованием реактива Siemens.

Для количественных данных рассчитывали среднее арифметическое значение и стандартную ошибку ($M \pm m$), для качественных – абсолютные и относительные (%) значения. Анализ динамики количественных показателей проводили при помощи критерия Стьюдента для связанных выборок.

Результаты

До проведения трансиммунизации среднее значение ФНО- α у обследуемых взрослых больных рассеянным склерозом составило $9,958 \pm 0,812$ ($M \pm m$) при норме менее 8,1 пг/мл. После проведения трансиммунизации показатель снизился до $6,992 \pm 0,367$ пг/мл ($p < 0,05$) (рис. 1), или на 30%.

У больного А. после курса трансиммунизации уровень ФНО- α в крови снизился почти вдвое: с 14,6 до 7,8 пг/мл, то есть составил 53% от первоначального значения. У больной С. после трансиммунизации показатель уровня ФНО- α в крови уменьшился на 20% (с 11,2 до 9 пг/мл), у больной Б. – на 21% (с 8,9 до 7,1 пг/мл).

У ряда пациентов проведено несколько исследований показателя ФНО- α . Так, у больной И. перед началом 2-го курса трансиммунизации уровень ФНО- α составил 8 пг/мл, после – 6,7 пг/мл; перед 3-м курсом – 9,5 пг/мл, после – 8,9 пг/мл; перед 4-м курсом – 8,4 пг/мл, после – 7,5 пг/мл; перед 5-м курсом – 7,8 пг/мл, после – 7,5 пг/мл (рис. 2). Таким образом, снижение составило 16, 6, 11 и 4% соответственно. У больной К. значение

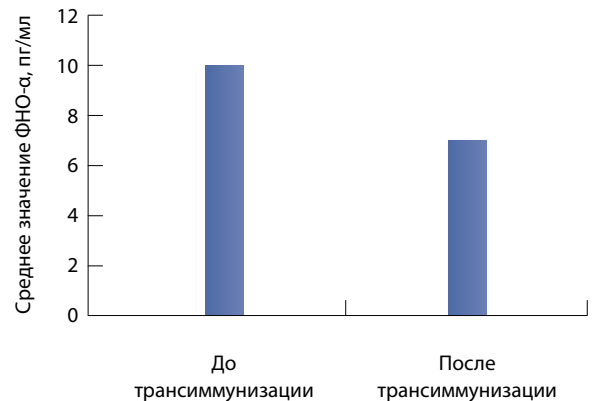


Рис. 1. Динамика среднего значения фактора некроза опухоли-альфа (ФНО- α) на фоне трансиммунизации у больных рассеянным склерозом ($n = 13$); $p < 0,05$

ФНО- α перед 1-м курсом трансиммунизации было 9,2 пг/мл, после – 7 пг/мл; перед 4-м курсом – 7,1 пг/мл, после – 6,3 пг/мл; перед 7-м – 14,7 пг/мл, после – 8,5 пг/мл (рис. 3). Соответственно, динамика снижения показателя была 24, 11 и 42%. У больной В. перед 2-м курсом трансиммунизации показатель ФНО- α был 7,1 пг/мл, после – 5,5 пг/мл, то есть снизился на 23%; перед 4-м курсом – 8,6 пг/мл, после – 4,1 пг/мл, снижение составило 52%; через 1 месяц отмечено повышение показателя до 7,7 пг/мл (в пределах нормальных значений).

Обсуждение и заключение

У больных рассеянным склерозом при проведении ультрафиолетового облучения моноцитов периферической крови с их последующей инкубацией (трансиммунизация) отмечалось сниже-

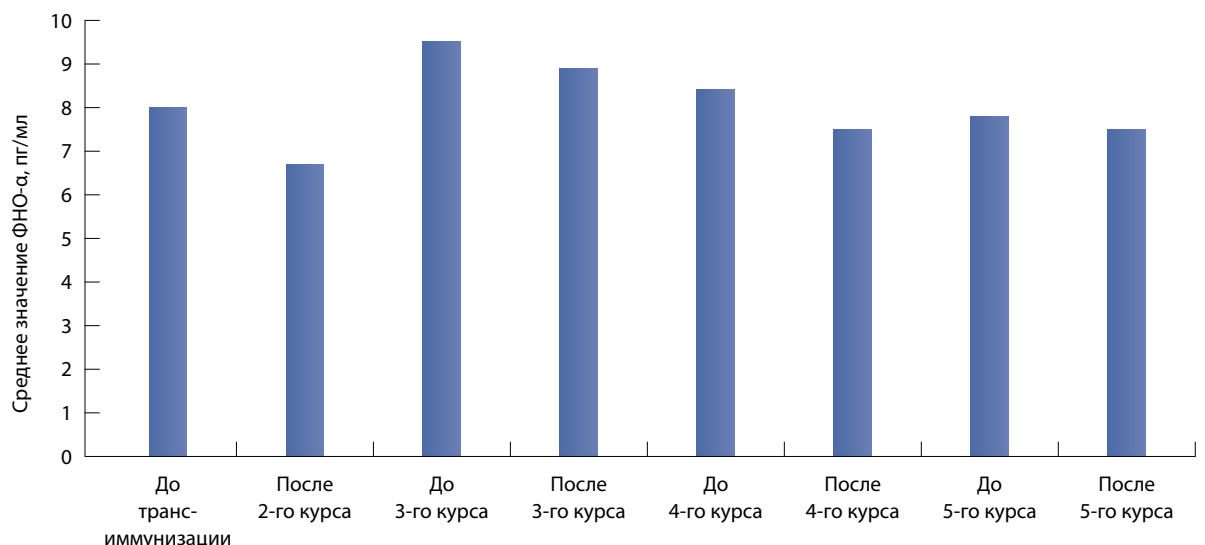


Рис. 2. Динамика значения фактора некроза опухоли-альфа (ФНО- α) у больной И. на фоне трансиммунизации

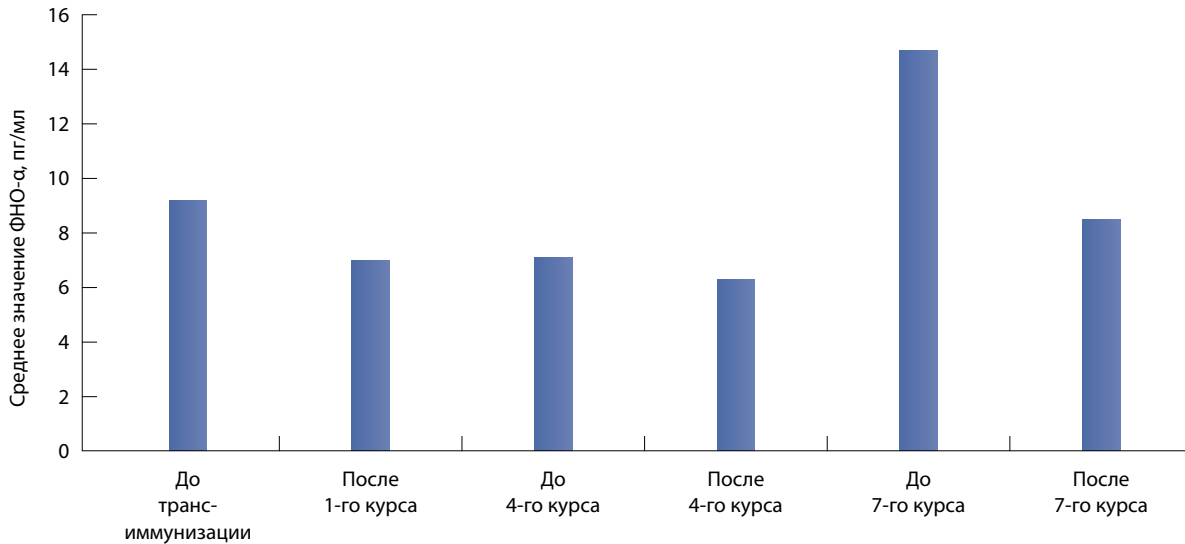


Рис. 3. Динамика значения фактора некроза опухоли-альфа (ФНО-α) у больной К. на фоне трансиммунизации

ние уровня ФНО-α, что свидетельствует о противовоспалительном действии трансиммунизации. Полученные нами данные совпадают с результатами исследования G. Cavaletti и соавт. [11], которые выявили значительное снижение уровня ФНО-α у крыс при использовании экстракорпоральной фототиотерапии.

В нашем наблюдении показатели уровня ФНО-α уменьшались, достигая нормальных значений. Средний показатель уменьшился на 30%, в отдельных случаях снижение достигало 47–52%.

Трансиммунизация оказывала супрессивное, но не агрессивное воздействие на ФНО-α, так как его уровень нормализовался и, падая, не достигал критических значений. Выявленные изменения представляются нам важными, поскольку значительное снижение уровня ФНО-α может само по себе привести к демиелинизации [7–10].

Таким образом, трансиммунизация оказывает противовоспалительное действие у больных рассеянным склерозом, вызывая снижение уровня ФНО-α. ☺

Литература

- Lorré K, Fransen L, Ceuppens JL. Interleukin-2 induces tumor necrosis factor-alpha production by activated human T cells via a cyclosporin-sensitive pathway. *Eur Cytokine Netw.* 1992;3(3):321–30.
- Benvenuto R, Paroli M, Buttinelli C, Franco A, Barnaba V, Fieschi C, Balsano F. Tumour necrosis factor-alpha synthesis by cerebrospinal-fluid-derived T cell clones from patients with multiple sclerosis. *Clin Exp Immunol.* 1991;84(1):97–102.
- Piotrowska K, Korlak J, Kruszezwska J, Iwińska B, Członkowska A. Secretion of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) by peripheral blood monocytes in patients with multiple sclerosis and subacute sclerosis panencephalitis. *Neurol Neurochir Pol.* 1991;25(4):455–9.
- Ruffini F, Chojnacki A, Weiss S, Antel JP. Immunobiology of oligodendrocytes in multiple sclerosis. *Adv Neurol.* 2006;98:47–63.
- Вострякова СА, Алифирова ВМ, Иванова СА, Орлова ЮЮ. Апоптоз лимфоцитов у больных рассеянным склерозом. *Бюллетень сибирской медицины.* 2008;7 Прилож. 1: 200–3.
- Obradović D, Kataranovski M, Dincić E, Obradović S, Colić M. Tumor necrosis factor-alfa and interleukin-4 in cerebrospinal fluid and plasma in different clinical forms of multiple sclerosis. *Vojnosanit Pregl.* 2012;69(2):151–6.
- Sicotte NL, Voskuhl RR. Onset of multiple sclerosis associated with anti-TNF therapy. *Neurology.* 2001;57(10):1885–8.
- Andreadou E, Kemanetzoglou E, Brokalaki Ch, Evangelopoulos ME, Kilidireas C, Rombos A, Stamboulis E. Demyelinating disease following anti-TNFα treatment: a causal or coincidental association? Report of four cases and review of the literature. *Case Rep Neurol Med.* 2013;2013:671935. doi: 10.1155/2013/671935.
- Balsalobre Aznar J, Porta-Etessam J, Salvatierra Ossorio J, Rosales-Alexander JL. Tumor necrosis factor-alpha antagonist and demyelinating diseases. *J Neurol Neuroscience.* 2013;4(3):2–6. doi: 10.3823/339.
- Honda Y, Otsuka A, Egawa G, Inoue Y, Kuzuya A, Takahashi R, Miyachi Y, Kabashima K. Multiple neurological abnormalities, including pontine hemorrhage, multiple sclerosis and aseptic meningitis, during anti-TNF-α therapy in psoriatic arthritis. *Eur J Dermatol.* 2015;25(5):487–8. doi: 10.1684/ejd.2015.2558.
- Cavaletti G, Perseghin P, Dassi M, Oggioni N, Sala F, Braga M, Lolli F, Riccio P, Carlone G, Zoia C, Tagliabue E, Stanzani L, Galbiati S, Rigamonti L, Marmiroli P, Ferrarese C, Frattola L, Tredici G. Extracorporeal photochemotherapy reduces the severity of Lewis rat experimental allergic encephalomyelitis through a modulation of the function of peripheral blood mononuclear cells. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2004;18(1):9–17.
- Girardi M, Schechner J, Glusac E, Berger C, Edelson R. Transimmunization and the evolution of extracorporeal photochemotherapy. *Transfus Apher Sci.* 2002;26(3):181–90. doi: 10.1016/S1473-0502(02)00011-3.



References

- Lorré K, Fransen L, Ceuppens JL. Interleukin-2 induces tumor necrosis factor-alpha production by activated human T cells via a cyclosporin-sensitive pathway. *Eur Cytokine Netw.* 1992;3(3):321–30.
- Benvenuto R, Paroli M, Buttinelli C, Franco A, Barnaba V, Fieschi C, Balsano F. Tumour necrosis factor-alpha synthesis by cerebrospinal-fluid-derived T cell clones from patients with multiple sclerosis. *Clin Exp Immunol.* 1991;84(1):97–102.
- Piotrowska K, Korlak J, Kruszewska J, Iwińska B, Członkowska A. Secretion of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) by peripheral blood monocytes in patients with multiple sclerosis and subacute sclerosing panencephalitis. *Neurol Neurochir Pol.* 1991;25(4):455–9.
- Ruffini F, Chojnacki A, Weiss S, Antel JP. Immunobiology of oligodendrocytes in multiple sclerosis. *Adv Neurol.* 2006;98:47–63.
- Vostryakova SA, Alifirova VM, Ivanova SA, Orlova YuYu. Apoptoz limfotsitov u bol'nykh rasseyannym sklerozom [Apoptosis cells in patients with multiple sclerosis]. *Byulleten' sibirskoy meditsiny [Bulletin of Siberian Medicine].* 2008;7 Suppl. 1:200–3 (in Russian).
- Obradović D, Kataranovski M, Dincić E, Obradović S, Colić M. Tumor necrosis factor-alfa and interleukin-4 in cerebrospinal fluid and plasma in different clinical forms of multiple sclerosis. *Vojnosanit Pregl.* 2012;69(2):151–6.
- Sicotte NL, Voskuhl RR. Onset of multiple sclerosis associated with anti-TNF therapy. *Neurology.* 2001;57(10):1885–8.
- Andreadou E, Kemanetzoglou E, Brokalaki Ch, Evangelopoulos ME, Kilidireas C, Rombos A, Stamboulis E. Demyelinating disease following anti-TNFa treatment: a causal or coincidental association? Report of four cases and review of the literature. *Case Rep Neurol Med.* 2013;2013:671935. doi: 10.1155/2013/671935.
- Balsalobre Aznar J, Porta-Etessam J, Salvatierra Ossorio J, Rosales-Alexander JL. Tumor necrosis factor-alpha antagonist and demyelinating diseases. *J Neurol Neuroscience.* 2013;4(3):2–6. doi: 10.3823/339.
- Honda Y, Otsuka A, Egawa G, Inoue Y, Kuzuya A, Takahashi R, Miyachi Y, Kabashima K. Multiple neurological abnormalities, including pontine hemorrhage, multiple sclerosis and aseptic meningitis, during anti-TNF-α therapy in psoriatic arthritis. *Eur J Dermatol.* 2015;25(5):487–8. doi: 10.1684/ejd.2015.2558.
- Cavaletti G, Perseghin P, Dassi M, Oggioni N, Sala F, Braga M, Lolli F, Riccio P, Carlone G, Zoia C, Tagliabue E, Stanzani L, Galbiati S, Rigamonti L, Marmiroli P, Ferrarese C, Frattola L, Tredici G. Extracorporeal photochemotherapy reduces the severity of Lewis rat experimental allergic encephalomyelitis through a modulation of the function of peripheral blood mononuclear cells. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2004;18(1):9–17.
- Girardi M, Schechner J, Glusac E, Berger C, Edelson R. Transimmunization and the evolution of extracorporeal photochemotherapy. *Transfus Apher Sci.* 2002;26(3):181–90. doi: 10.1016/S1473-0502(02)00011-3.

Changes in tumor necrosis factor alfa during treatment of patients with multiple sclerosis by transimmunization method

Kil'dyushevskiy A.V.¹ • Kotov S.V.¹ • Sidorova O.P.¹ • Borodin A.V.¹

Background: Despite the availability of a large number of treatments for multiple sclerosis with various targets, these treatments are not always effective. According to the literature, experimental studies have shown a significant decrease in tumor necrosis factor alfa (TNF-α) with the use of extracorporeal photochemotherapy. **Aim:** To assess changes in TNF-α in patients with multiple sclerosis during treatment with transimmunization. **Materials and methods:** The study recruited 13 adult patients with multiple sclerosis. Serum TNF-α was measured by immunochemiluminescence analysis (IMMULITE 1000, Siemens). The patients were treated by transimmunization, i.e. a modified photopheresis. Two hours before the procedure, Ammifurin (8-methoxypsoralene) was administered to all the patients, then their mononuclear cells were isolated under PBSC protocol with Haemonetics MCS+ cell separator. Thereafter, mononuclear cells were irradiated with ultraviolet for 90 minutes and incubated

for 20 hours at 37 °C. The next day the cells were re-infused to the patients. The procedure was performed 2 times per week for 6 months, then once per 4 months. **Results:** Before transimmunization, mean TNF-α level in adult patients with multiple sclerosis was 9.958 ± 0.812 pg/mL (normal, below 8.1 pg/mL). After transimmunization, its level was 6.992 ± 0.367 pg/mL ($p < 0.05$). **Conclusion:** Ultraviolet irradiation of peripheral blood monocytes with their subsequent incubation (transimmunization) led to a 30% decrease of serum TNF-α in patients with multiple sclerosis. This indicates a suppressive effect of transimmunization on TNF-α. Hence, in patients with multiple sclerosis transimmunization exerts an anti-inflammatory effect.

Key words: multiple sclerosis, transimmunization, photopheresis, extracorporeal photochemotherapy

Kil'dyushevskiy Aleksandr V. – MD, PhD, Professor, Leading Research Fellow, Surgical Hemocorrection and Detoxication Department¹

Kotov Sergey V. – MD, PhD, Professor; Head of Department of Neurology; Head of Chair of Neurology, Postgraduate Training Faculty¹

✉ 61/2–10 Shchepkina ul., Moscow, 129110, Russian Federation. Tel.: +7 (495) 631 73 62. E-mail: kotovsv@yandex.ru

Sidorova Olga P. – MD, PhD, Professor, Leading Research Fellow, Department of Neurology; Chair of Neurology, Postgraduate Training Faculty¹

Borodin Aleksandr V. – MD, Neurologist, Department of Neurology¹

¹ Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI); 61/2 Shchepkina ul., Moscow, 129110, Russian Federation