

# = НА ДОПОМОГУ ПРАКТИКУЮЧОМУ ЛІКАРЮ =

## ІМУНОЛОГІЧНЕ ПРОГНОЗУВАННЯ ПЕЧІНКОВОЇ ЕНЦЕФАЛОПАТІЇ У ХВОРИХ НА ГОСТРИЙ ГЕПАТИТ В

Б.А. Герасун

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

**Зв'язок з автором:** Герасун Борис Абрамович, д.мед.н., професор кафедри інфекційних хвороб ЛНМУ ім. Данила Галицького; тел.: +380669082759; e-mail: gerab@3g.ua

У статті йдеться про метод дослідження активації Т-лімфоцитів у хворих на гострий гепатит В (ГВ) з метою прогнозування можливого розвитку печінкової енцефалопатії. Стан Т-лімфоцитів у хворих на ГВ оцінювали за здатністю специфічних антитіл до інгібіції Е-розеткоутворення. При цьому виходили з того, що Е-рецептори, які належать до кластера CD2, є головною ланкою альтернативного шляху активації Т-клітин. Як антитіла для Е-рецепторів використовували антилімфоцитарний імуноглобулін (АЛІ). Визначали чутливість Е-РУК до антитіл проти Т-лімфоцитів (тобто до антилімфоцитарного імуноглобуліну). Встановлено, що у хворих на гострий ГВ чутливість лімфоцитів до АЛІ залежить від важкості хвороби. Спостереження за чутливістю лімфоцитів до АЛІ у хворих на ГВ своєчасно виявляє активацію Т-лімфоцитів, що дозволяє прогнозувати несприятливі зміни у перебігу хвороби.

**Ключові слова:** гострий гепатит В, прогнозування печінкової енцефалопатії, інгібіція Е-РУК, антилімфоцитарний імуноглобулін, феномен розеткоутворення.

## ИММУНОЛОГИЧЕСКОЕ ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ПЕЧЕНОЧНОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ У БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ ГЕПАТИТОМ В

Б.А. Герасун

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

В статье рассматривается метод определения активации Т-лимфоцитов у больных острым гепатитом В с целью прогнозирования возможного развития печеночной энцефалопатии. Уровень активности Т-лимфоцитов у больных гепатитом В оценивали по способности специфических антител к ингибции Е-розеткообразования. При этом исходили из того, что Е-рецепторы, относящиеся к кластеру CD2, являются главным признаком альтернативного пути активации Т-клеток. В качестве антител для Е-рецепторов использовали

антилимфоцитарний иммуноглобулін (АЛИ). Определяли чутливість Е-РОК к антителам против Т-лимфоцитів (то єсть к антилимфоцитарному иммуноглобуліну). Установлено, що у больних с острым ГВ чутливість лимфоцитів к АЛИ зависит от тяжести болезни. Наблюдение за чутливістю лимфоцитів к АЛИ у больних с острым ГВ своєчасно определяет активацию Т-лимфоцитів, что позволяет прогнозировать неблагоприятные изменения в течении болезни.

**Ключевые слова:** острый гепатит В, прогнозирование печеночной энцефалопатии, ингибирование Е-РОК, антилимфоцитарный иммуноглобулин, феномен розеткообразования.

## IMMUNOLOGICAL PROGNOSIS OF LIVER ENCEPHALOPATHY IN PATIENTS WITH ACUTE HEPATITIS B

B.A. Herasun

Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

The article presents the method of investigation of T-lymphocyte activation in patients with acute hepatitis B (HBV) to prognosticate possible development of liver encephalopathy. The condition of T-lymphocytes in patients with HCV was estimated by the ability of specific antibodies to inhibit E-rosetting. It was taken into consideration that E-receptors that belong to CD2 cluster are the main branch of an alternative way of T-cell activation. Anti-lymphocyte immunoglobulin (ALG) was used as antibodies for E-receptors. Sensitivity of E-RFC to antibodies against T-lymphocytes (i.e. anti-lymphocyte immunoglobulin) was detected. It has been established that in patients with acute HBV, sensitivity of lymphocytes to ALG depends on the severity of the disease. Monitoring of lymphocyte sensitivity to ALG in patients with HBV detects activation of T-lymphocytes early, which allows prognosticating unfavorable changes in disease course.

**Key words:** Acute hepatitis B, prognosis of liver encephalopathy, E-RFC inhibition, anti-lymphocyte immunoglobulin, phenomenon of rosetting.

Проблема імунологічного моніторингу для контролю за перебігом хвороби в інфектології недостатньо розроблена. Проте вона є пріоритетним напрямком для вивчення такої інфекційної хвороби як вірусний гепатит В (ГВ), бо її безперечно можна віднести до захворювань імуноної системи.

При ГВ реплікація вірусу призводить до вбудовування вірусоспеци-

фічних антигенів до мембрани гепатоцитів, а це сприяє розвитку імуноної атаки печінки [1-4]. Головною причиною ушкодження інфікованих клітин є Т-клітинні автоімуноагресивні реакції, скеровані проти клітин, на поверхні яких є вірусні антигени та модифіковані ними власні антигени, що розпізнаються цитотоксичними Т-лімфоцитами [4]. В умовах недостат-

ності мембранного апарату гепатоцитів гіперергічна реакція імуніцитів призводить до розвитку масивного некрозу печінки. Отже, доведено, що найсуттєвішим механізмом ураження гепатоцитів у хворих на ГВ є імунний апоптоз, який переважно відбувається внаслідок клітинного імунітету, насамперед за участю цитотоксичних Т-лімфоцитів. Обов'язковим елементом імуніпатогенезу фульмінантних форм є масивне зараження та особливо сильний тип імунної відповіді. Розвитку процесу сприяє слабкість клітинних мембран («лізосомальний вибух», за Poper). У зв'язку з цим доцільно нагадати, що концепція патогенезу ГВ як хвороби імунної відповіді була розроблена Blumberg і співаторами ще у 1969 р.; з нею узгоджувалися роботи В.М. Жданова (1975) та Hirshman (1971-75), які розглядали ГВ як інтегративну інфекцію.

У подальшому ця концепція перетворилась на імунно-інтегративну теорію патогенезу. Було доведено, що різноманітність форм перебігу ГВ зумовлена імунозалежними ураженнями печінки [4, 5-7].

Для спостереження за перебігом специфічних імуніпатогенетичних процесів у тканині печінки застосовувалися клітинні реакції, які відбуваються на мембрані гепатоцитів. При цьому не враховувалося, що феномен цитотоксичності є універсально поширеним процесом і його виявлення не обов'язково свідчить про загрозу масивного некрозу печінки: Т-лімфоцитарні рецептори в більшості з цих антигенів наявні майже у по-

ловини хворих на ГВ. Тому цей феномен, безумовно пов'язаний із запально-деструктивними процесами в печінці, мало придатний до прогнозування печінкової енцефалопатії. Особливості патогенезу ГВ вказують на актуальність вдосконалення імунітологічного моніторингу лімфоцитарної активності для своєчасного виявлення періодів активації Т-лімфоцитів – центральної «фігури» імунної відповіді.

Для цього ми ще в минулому столітті розробили достатньо чутливий метод прогнозування активації Т-лімфоцитів (тобто метод прогнозування можливого розвитку печінкової енцефалопатії) [3]. У наших дослідженнях стан Т-лімфоцитів у хворих на ГВ оцінювали за здатністю специфічних антитіл до інгібіції Е-розеткоутворення. При цьому виходили з того, що Е-рецептори, які належать до кластера CD2, є головною ланкою альтернативного шляху активації Т-клітин. Відомо, що залежно від особливостей імунітологічного статусу чутливість лімфоцитів до специфічних антитіл змінюється. Можна вважати, що специфічні антитіла є інструментом оцінки мембран, рецепторного апарату імунікомпетентних клітин.

Як такі антитіла ми використовували антилімфоцитарний імуніглобулін (АЛІ). Для цього визначали чутливість Е-РУК до антитіл проти Т-лімфоцитів (тобто до антилімфоцитарного імуніглобуліну).

Препарат безпосередньо впливає на лімфоцити і може застосовуватись

з лікувальною метою для пригнічення автоагресивних процесів, а також для вивчення особливостей імунної відповіді. У досліджах *in vitro* препарати антилімфоцитарного імуноглобуліну мають здатність викликати бласттрансформацію лімфоцитів; змінювати їхню електрофоретичну рухливість; аглютинувати або лізувати клітини; гальмувати феномен розеткоутворення, відмінити цитотоксичний ефект і впливати практично на всі характерні реакції.

Такого роду імунологічний моніторинг був на той час вже розроблений для використання у клінічній практиці, зокрема у трансплантології, для прогнозування кризи відторгнення нирок [8]. Враховуючи, що цей метод у практиці клінічної трансплантології свідчить про інтенсивність імунної відповіді, ми випробували можливість його використання при ХГВ для визначення генетично детермінованої сили імунної відповіді, скерованої на гепатоцити, у мембрані яких вбудовані антигени HBV. За нашими даними, було доцільним випробування цього методу для прогнозування загрози розвитку фульмінантного гепатиту (на підставі визначення функціональної активності Т-лімфоцитів).

Наша методика прогнозування печінкової енцепалопатії вже давно опублікована. Проте, враховуючи, що з часом змінюються препарати антилімфоцитарних антитіл, ми продовжили дослідження. До того ж цей метод практично в Україні не використовується, хоча, по наших даних, є високоефективним. Саме тому ми і повертаємось до цієї проблеми.

**Матеріали та методи.** Відомо, що АЛІ містять антитіла до Е-рецепторів, і активність препарату зазвичай оцінюють за здатністю до інгібіції Е-РУК (E-rosette formation test). Спосіб ґрунтується на здатності АЛІ пригнічувати феномен розеткоутворення з еритроцитами барана.

Лейкоцити вилучають з гепаринізованої венозної крові в градієнті щільності верографін-фіколу, тричі відмивають в охолоджену розчині Хенкса, ресуспендують у середовищі N 199 і доводять до концентрації  $2 \times 10^9$  кл/мл. Для визначення активності АЛІ по інгібіції Е-РУК готують ряд подвійних розведень імуноглобуліну на середовище 199. До всіх проб додають комплемент і однакову кількість лімфоцитів (у контрольних пробах замість АЛІ – розчин 0,89% хлориду натрію). Проби інкубують при 37°C протягом 60 хв., після чого лімфоцити відмивають від АЛІ та додають 0,5% суспензію еритроцитів барана. Суміш лейкоцитів і еритроцитів відразу ж (без попередньої інкубації) центрифугують при 200g 7 хвилин, ресуспендують обережним обертанням пробірок, і для фіксації розеток додають 0,6% розчин глютарового альдегіду. Потім клітини відмивають, готують мазки, фарбують [3].

У кожному препараті підраховують процент клітин, що утворили розетки. Граничне розведення АЛІ, яке викликає зниження числа Е-РУК на 25%, порівняно з контролем, вважають титром його імуносупресивної активності. При цьому нерідко виявляється, що величина, яка прийма-

ється за титр, знаходиться між двома послідовними розведеннями білка. Тому показники розеткоутворення зображають графічно, для чого будують криву, і від точки, в котрій число Е-РУК на 25% менше, ніж у контролі, опускають перпендикуляр на вісь абсцис, з відкладеними на ній величинами розведення (рис.1).

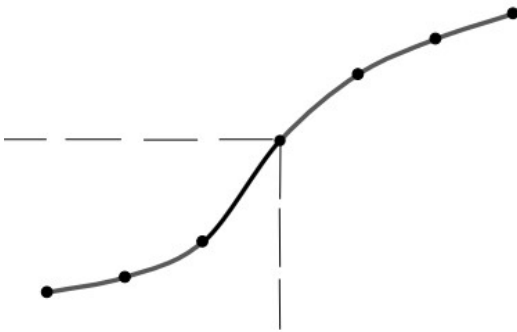


Рисунок 1. Визначення титру АЛІ в досліді інгібіції Е-РУК (пояснення в тексті). Позначення: по осі абсцис - розведення АЛІ; по осі ординат - відсоток Е-РУК

За весь тривалий період дослідження було обстежено 180 здорових людей (донорів крові) у віці від 18 до 55 років та 315 дорослих хворих на ХГВ.

**Результати та їх обговорення.** Всі препарати АЛІ різного виробництва, що були використані протягом багаторічного дослідження, виявилися придатними для виконання методу прогнозування печінкової енцефалопатії.

Встановлено, що показники активності препарату, інгібуючого Е-РУК, не є сталою величиною, а залежать від багатьох умов. Так, у здорових людей титр препарату коливався у відносно низьких межах: від 1:2000 до 1:7000. Натомість при ГВ діапазон коливань

виявився значно більшим: титри АЛІ в окремих хворих досягали 1:30000-1:100000.

Аналіз розподілу титрів АЛІ показав, що існує залежність між чутливістю до препарату і станом особи, що обстежується. У хворих на гострий ГВ чутливість лімфоцитів до АЛІ залежала від важкості хвороби. При легкій формі хвороби вона відносно помірно збільшувалась і титр препарату в окремих дослідженнях коливався від 1:10 000 до 1:35 000. Особи з високою чутливістю лімфоцитів до АЛІ зустрічалися лише серед хворих з важким та середньо важким перебігом хвороби: титр АЛІ при обстеженні окремих пацієнтів коливався в межах від 1: 30 000 до 1:130 000. Проте на відміну від важких форм ГВ із сприятливим кінцем, у хворих, схильних до розвитку печінкової енцефалопатії і під час енцефалопатії, розвивається резистентність до АЛІ. Це проявляється значним зменшенням інгібуючої активності антилімфоцитарних антитіл. Так, у дослідях з лейкоцитами, виділеними з крові хворих, що загинули від ГВ, і хворих в різних стадіях прекоми, пригнічення Е-РУК вдавалося досягти лише шляхом внесення значної концентрації антитіл (титр інгібуючої активності АЛІ зменшувався до 1:1000 – 2000).

При покращенні стану хворого (виведення його зі стану енцефалопатії), титри інгібуючої активності АЛІ зростали.

Отже, особливої уваги заслуговує те, що низька активність АЛІ зареєстрована при обстеженні хворих з

особливо тяжким (злоякісним) перебігом ВГВ. У хворих з ознаками печінкової енцефалопатії підвищувалась стійкість лімфоцитів до впливу специфічних антитіл та відповідно зменшувалися титри препарату, за даними його впливу на феномен розеткоутворення. Так, у 12 хворих, померлих від ГВ, та 38, що знаходилися на різних стадіях прекоми, пригнічення розеткоутворення вдавалося лише внесенням високої концентрації АЛІ – титр препарату зменшувався до 1:1000 – 1:2000. Отже, ці показники наближались до тих, що були отримані при обстеженні здорових людей. Таким чином, у хворих чутливість лімфоцитів до специфічних антитіл змінювалась «в різні сторони».

Наведемо клінічні приклади, що ілюструють це положення.

Хвора П., 52 роки, дожовтяничний період перебігав за астеновегетативним типом. При госпіталізації виражена загальна слабкість, анорексія, нудота. Загальний білірубін крові 271,25 мкмоль/л, активність АлАТ - 29 ммоль/год. л.; виявлені HBV DNA, HBsAg, anti-HBc IgM. Через 4 дні рівень білірубіну збільшився до 358,2 мкмоль/л; активність АлАТ - 34 ммоль/год.л. За два тижні стан хворої покращився, рівень білірубіну в крові зменшився до 40 мкмоль/л, проте було зазначено різке зростання резистентності лімфоцитів до АЛІ: титр препарату в досліді з лімфоцитами хворої - 1:1000. Через тиждень стан хворої знову погіршився: білірубін піднявся до 360 мкмоль/л, розвинулась загальна слабкість, періодично – загальмованість, сонливість,

блювання, почали зменшуватись розміри печінки. Стан розцінено як прекоматозний. Проведена інтенсивна дезінтоксикаційна терапія, призначений глюкокортикостероїдний гормон та ін. Стан хворої покращився, явища енцефалопатії зникли, проте утримувались жовтяниця та інтоксикація. У цей період відбулось підвищення чутливості лімфоцитів до АЛІ: титр збільшився до 1:8000, і на цьому рівні утримувався протягом трьох тижнів. Лише в період повної нормалізації рівня білірубіну та активності АлАТ на фоні задовільного стану хворої титр АЛІ в тесті гальмування Е-РУК збільшився і досяг 1:32000. На такому рівні він утримувався протягом трьох місяців. Період реконвалесценції перебігав нормально.

Особливість цього спостереження в тому, що розвиток резистентності до АЛІ (титр 1:1000) передував розвитку енцефалопатії.

Хвора К., 18 років, діагноз гострий ГВ. Вперше була обстежена в клінічній стадії прекоми (виражені нервово-психічні розлади, сплутана свідомість, періодично – втрата свідомості). Жовтяниця інтенсивна. Титр АЛІ, за даними пригнічення Е-РУК, становив 1:2000. Після інтенсивної дезінтоксикаційної та імунокорегуючої терапії, зокрема, глюкокортикостероїдними гормонами, з покращенням загального стану чутливість лімфоцитів до АЛІ почала зростати і перед випискою зі стаціонару титр АЛІ у досліді інгібіції Е-РУК становив 1:16000.

Таким чином, у хворих з особливо важким ГВ пригнічення Е-РУК дося-

гається лише шляхом внесення анти-тіл у значній концентрації, що в одній із використаних систем АЛІ відповідало титрам 1:1000 – 1:2000 (при титрі 1:2000 концентрація білка становила 0,02 мг/мл). Отже, цей рівень чутливості лімфоцитів до АЛІ (0,02 мг/мл білка) є критичним і свідчить про можливість розвитку печінкової енцефалопатії.

Такі закономірності не спостерігаються при хронічному ГВ.

Перевага цього тесту в тому, що спрямованість його змін при важкому і особливо важкому перебігу ВГ відрізняється. У першому випадку чутливість до АЛІ зростає, в другому – клітини стають резистентними до специфічних антитіл, що можна пояснити посиленням їх функціональної активності.

У літературі з трансплантології зменшення чутливості лімфоцитів до

АЛІ у дослідях з розеткоутворенням розглядається як вказівка на підвищення їх функціональної активності та підстава для потужної імуносупресивної терапії. У наших дослідженнях при ГВ отримані аналогічні результати.

Що стосується механізму підвищеної чутливості лімфоцитів до АЛІ при гострому ГВ, то цей феномен пояснити складно. На нашу думку, це пов'язано з імуносупресією, зумовленою ГВ.

**Висновки.** Спостереження за чутливістю лімфоцитів до АЛІ у хворих на ГВ своєчасно виявляє активацію Т-лімфоцитів, що дозволяє прогнозувати несприятливі зміни у перебігу хвороби та спостерігати за ефективністю імунокорегуючої терапії. Отже, цю методику доцільно використовувати у клінічній практиці.

## Література

1. Шерлок Ш., Дули Дж. Заболевания печени и желчных путей//Пер. с англ.-М.Геотар Медицина, 1999.- 859 с.
2. Аммосов А.Д. Гепатит В.- Кольцово: Институт средств медицинской диагностики ЗАО «Вектор-Бест», 2005.-128с.
3. Герасун Б.А. Вірусний гепатит В. НВ-вірусна інфекція /ЛНМУ ім. Данила Галицького, Львів, 1993.-173 с.
4. Михайлов М.И., Мамедов М.К. Вирусные гепатиты В и С у онкологических больных.- М.:ВК., 2012.- 228 с.
5. Блюгер А.ф., Векслер Х.М. Новые аспекты вирусно-иммуногенетической концепции патогенеза вирусных гепатитов//. Новое в гепатологии.- Рига: РМИ.-1988.-С.15-18.
6. Громашевская Л.Л. Вирусные гепатиты с парентеральным механизмом передачи возбудителей и их исходы.-К.,2001.-С.97-101.
7. Рейзис А.Р., Матанина Н.В., Шмаров Д.А. Роль апоптоза лимфоцитов периферической крови в патогенезе вирусных гепатитов и возможности медикаментозной коррекции// Сб. докладов Всероссийской научно-практической конференции «Вирусные гепатиты – проблемы эпидемиологии, диагностики, лечения и профилактики».-М. 2005.- С.276-278.
8. Иммунология. За ред. Г. Буншу, Б. Шнеевайса. Переклад з німецької. - К.: «Наукова думка».- 1981. -479 с.