



УКРАЇНА

(19) UA (11) 62381 (13) A

(51) 7 A61B10/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ  
НА ВИНАХІДВИДАЄТЬСЯ ПІД  
ВІДПОВІДАЛЬНІСТЬ  
ВЛАСНИКА  
ПАТЕНТУ

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ РОЗВИТКУ АВТОІМУННИХ РЕАКЦІЙ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНІ ГЕПАТИТИ

1

2

(21) 2003032203

(22) 13 03 2003

(24) 15 12 2003

(46) 15 12 2003, Бюл. № 12, 2003 р

(72) Нейко Євгеній Михайлович, Вірстюк Наталія Григорівна, Оринчак Марія Андрівна, Дикий Богдан Миколайович, Ковальчук Лариса Євгенівна

(73) Нейко Євгеній Михайлович, Вірстюк Наталія Григорівна, Оринчак Марія Андрівна, Дикий Богдан Миколайович, Ковальчук Лариса Євгенівна

(57) Спосіб прогнозування розвитку автоімунних реакцій у хворих на хронічні гепатити, який вклю-

чає загальноклінічне та гістологічне обстеження, визначення вмісту глобулінів, гамаглобулінів, імунглобулінів, циркулюючих імунних комплексів, показників клітинного імунітету з визначенням імунорегуляторного індексу, специфічних і неспецифічних автоантитіл в крові, який відрізняється тим, що додатково визначають вміст у крові бета<sub>2</sub>-мікроглобуліну (β<sub>2</sub>-мг), експресію Fas/APO-1(CD95) на лімфоцитах периферичної крові, кількість патологічно змінених ядер гепатоцитів

Винахід відноситься до медицини, зокрема до розділу гепатології, а саме до способу прогнозування розвитку автоімунних реакцій у хворих на хронічні гепатити

Відомо, що проблема хронічних запальних захворювань печінки на теперішній час є однією з найбільш важливих в сучасній гастроентерології, має загальномедичне і соціальне значення [2, 4, 6, 21]. Спектр цих захворювань печінки дуже широкий-це різні варіанти хронічних гепатитів (ХГ) і, в кінцевому рахунку, нерідко цироз печінки (ЦП). В цілому по Україні за 5 років захворюваність на ЦП зросла на 76,6%, поширеність ЦП-на 59,6% [19]. Все частіше відзначається автоімунна природа гепатитів [13].

Відомо, що розвиток автоімунних реакцій у хворих на хронічні гепатити різної етіології супроводжується активним прогресуючим перебігом захворювання, активацією фіброзоутворення в печінці з більш швидким розвитком ЦП [8, 13, 14, 23, 33]. Віруси, зокрема гепатиту А, В, С та ін, розглядаються як головні кандидати для індукції автоімунних захворювань, в тому числі автоімунного гепатиту (АІГ) [4, 24]. Тригерну роль в розвитку АІГ можуть виконувати токсико-алергічні агенти та медикаменти [9, 21, 22].

Відомо, що розвиток АІГ зумовлений реакцією імунної системи перш за все на органоспецифічні автоантигени [8, 20, 23, 35], якими можуть виступати нуклеотидні упамки нерепарованої ДНК, фраг-

менти незрілої РНК, поліпептидного ланцюга та каріопеми, тобто цитогенетично порушені структури гепатоцитів. Відомо, що апоптоз, опосередкований Fas-системою, розглядається як один з основних механізмів пошкодження гепатоцитів при хронічних гепатитах різної етіології [3, 5, 7, 11, 17, 25, 27, 31, 34, 37]. Ряд авторів вказують на участь бета<sub>2</sub>-мікроглобуліну

(β<sub>2</sub>-МГ)-низькомолекулярного білка, що є інтегрованою частиною молекули основного комплексу гістосумісності HLA I типу, в розвитку імунних реакцій [26, 29].

Відомо, що реакції гіперчутливості сповільненого типу обумовлюють появу в печінці та інших органах і тканинах лімфомакрофагальних інфільтратів. Можливе поєднання реакцій гіперчутливості сповільненого типу та імунотоксичних, з якими зв'язують розвиток васкулітів. Клінічно розвиток автоімунних реакцій проявляється позапечінковими проявами такими як змішана кропоблуїнія, мембранопроліферативний гломерулонефрит, пізня шкірна порфірія, автоімунний тиреоїдит, синдром Шегрена та ін. [16, 22, 30, 36, 38, 39, 40]. Морфологічно для АІГ характерний склад клітинних інфільтратів в тканині печінки, які включають велику кількість хелперів-лімфоцитів в портальних трактах, переважання супресорних/цитотоксичних лімфоцитів у ділянках піщемального некрозу, наявність В-клітин і натуральних кілерів [4, 13, 18,

(13) A

(11) 62381

(19) UA

20] Лабораторно розвиток аутоімунних реакцій при хронічних гепатитах характеризується збільшенням вмісту глобулінів, гамаглобулінів, імуноглобуліну G та появою в крові аутоантитіл-антинуклеарних, антигладком'язових, антимікросомальних (печінка/нирки) у високому титрі та антитітохондріальних згідно критеріїв Міжнародної групи по вивченню АІГ [4, 14, 22, 35]. За аутоімунний характер захворювання можуть вказувати зміни показників клітинної ланки імунітету із збільшенням імунорегуляторного індексу [12].

Недоліками всіх попередніх способів є те, що вони дають можливість діагностувати розвиток аутоімунних реакцій при хронічних гепатитах різної етіології, а не прогнозувати їх на ранніх стадіях. Відомо, що лікування аутоімунних реакцій при хронічних гепатитах несе значно більші економічні затрати, ніж профілактичні заходи їх розвитку. Тому важливо розробити діагностичні критерії для прогнозування розвитку аутоімунних реакцій.

Суть винаходу пропонується всім хворим на хронічні гепатити різної етіології поряд із загальноклінічним, біохімічним та імунологічним обстеженням визначати наявність в крові маркерів ХГС та ХГВ, вміст у крові циркулюючих імунних комплексів (ЦІК), бета2-мікроглобуліну ( $\beta_2$ -МГ), експресію Fas/APO-1 (CD95) на лімфоцитах периферичної крові, кількість патологічно змінених ядер гепатоцитів з метою виявлення ризику розвитку аутоімунних реакцій.

В основу винаходу поставлено задачу прогнозування розвитку аутоімунних реакцій у хворих на хронічні гепатити на основі комплексного клініко-лабораторного і цитогенетичного обстеження пацієнтів для вибору раціональної терапії і попередження прогресування захворювання.

Об'єкт і методи дослідження

Під спостереженням було 455 пацієнтів, серед яких 375 (82,4%) хворих на хронічні гепатити і 80 (17,6%) на ЦП А і В стадій за Чайлд-Пью.

Всі хворі були розділені на 4 основних групи. Група хронічних вірусних гепатитів (ХВГ) включала 223 (49,0%) хворих, алкогольної хвороби печінки (АХП)-88 (19,3%), аутоімунних захворювань печінки-60 (13,2%), хронічних токсичних гепатитів (ХТГ)-84 (18,5%) хворих. Серед хворих на ХВГ було 134 (60,1%) випадки HBV-етіології, 122-хронічного гепатиту В (ХГВ), 12-ЦП та 89(39,9%)-HCV-етіології, 67-хронічного гепатиту С (ХГС), 22- ЦП. Серед хворих на АХП було 12 (13,6%) хворих на стеатоз печінки, 40 (45,5%) на алкогольний гепатит (АГ) та 36 (40,9%) на ЦП. Серед хворих на ХТГ у 28 (33,3%) випадках захворювання було пов'язане з тривалим контактом з хімічними чинниками, в 10 (35,7%) з них діагностовано ЦП, та у 56 (66,7%)-із вживанням медикаментів, зокрема, в 27 (48,2%)-нестероїдних протизапальних засобів, у 29 (51,8%) -сульфаніламідних. Хворі на ХТГ виділені в одну групу в зв'язку з однотипністю уражень печінки, а саме-розвиток внутрішньопечінкового холестазу. Серед хворих на аутоімунні захворювання печінки було 42 (70,0%) на АІГ та 18 (30,0%)-на первинний біліарний цироз (ПБЦ). Контрольну групу склали 20 практично здорових донорів.

Серед обстежених було 293 (64,4%) чоловіків і 162 (35,6%) жінки. Вік обстежених хворих коливав-

ся від 20 до 74 років, середній вік-(45,6 $\pm$ 7,7) роки. При цьому, хворих молодого віку було 77 (16,9%), зрілого-125 (27,5%), середнього-163 (35,8%), похилого-90 (19,8%). Тривалість захворювання складала в середньому (5,4 $\pm$ 2,7) років.

Дослідження проводили за розробленою програмою з ретельною оцінкою загальноклінічних, лабораторних показників, результатів інструментальних методів обстеження. В діагностиці хронічних захворювань печінки використовували класифікацію Міжнародної робочої групи і Всесвітнього конгресу гастроентерологів (Лос-Анжелес, 1994) та МКБ-10. Діагноз встановлювали на основі клінічних, ультразвукових, біохімічних, імунологічних та гістологічних досліджень [4, 6, 12, 14, 16, 22].

Критеріями включення хворих в групи спостереження були тривалість захворювання печінки більше 18 місяців, наявність клініко-лабораторних та ультразвукових доказів ураження печінки, виявлення серологічних маркерів гепатиту В і С, алкогольного, аутоімунного, токсичного генезу захворювання.

Проводили визначення вмісту в крові загального та прямого білірубіну, активності АсАТ, АлАТ, загального холестерину, бета-ліпопротеїдів, сечовини, креатиніну, загального білка та його фракцій, тимолової проби, показників коагулограми за стандартними методиками досліджень [6]. За методом біхроматичної спектрофотометрії на апараті STAT-FAX 1904 Plus (Нім.) проводили визначення активності ферментів ЛДГ, ЛФ, ГГТП, холінестерази, вмісту в крові загального холестерину, тригліцеридів, фосфоліпідів з використанням стандартних наборів.

Розвиток аутоімунних порушень підтверджували за наявністю в сироватці крові органоспецифічних-LKM-1 та органонеспецифічних -ANA, SMA, AMA аутоантитіл. Вміст LKM-1, ANA та AMA визначали імуноферментним, SMA-імунофлюоресцентним методами за методиками фірм-виробників. Для визначення LKM-1 використовували комерційні набори фірми "IMMCO Diagnostics" (США), ANA-"dark Laboratories" (США), AMA-"Immunodiagnosics" (США), SMA-"The Binding Site" (Великобританія).

Вміст IgA, IgG, IgM визначали за методом радіальної імунодифузії в агарозному гелі за Mancini (1965). Вміст ЦІК в сироватці крові визначали шляхом осадження їх розчином поліетиленгліколю (ПЕГ) з наступним визначенням оптичної густини досліджуваного розчину. Для визначення ЦІК різної молекулярної маси використовували розчини ПЕГ в концентрації 3%, 4% та 5,5%. Вміст  $\beta_2$ -МГ визначали в сироватці крові радіоімунним методом з використанням наборів РІО-БЕТА-2-МИКРО-125-І [Мінськ].

Активність процесу апоптозу лімфоцитів периферичної крові оцінювали за експресією Fas/APO-1 (CD95)-трансмембранного глікопротеїну. Експресію Fas/APO-1 (CD95) на периферичних лімфоцитах визначали за допомогою FITC-кон'югованих моноклональних антитіл фірми "Caltag laboratories" (США) імунофлюоресцентним методом згідно методики фірми-виробника. Виділення лімфоцитів із свіжої гепаринізованої периферичної крові також проводили в градієнті густини.

ни фікоп-верографіну з наступною стандартизацією їх до кінцевої концентрації  $2 \cdot 10^8$ /клтин в 1 мл. Контролем слугували 10 здорових донорів.

Маркери вірусів HBsAg, HBeAg, антиHBeAg, антиHBcAg IgM, антиHCV і антиHDV визначали в сироватці крові за допомогою комерційних наборів Diagnosticum Pasteur (Франція) на апараті фірми Sanofi імуноферментним методом (ELISA), HBV-ДНК та HCV-РНК-методом полімеразної ланцюгової реакції згідно алгоритму діагностики вірусних гепатитів [1].

Для гістологічного дослідження тканину печінки отримували шляхом пункційної біопсії. Фарбування проводили гематоксиліном і еозинном, за Ван-Гізеном та за Маллорі [18]. Для цитогенетичного дослідження були відібрані хворі з характерними як клініко-біохімічними проявами вказаних захворювань, так і гістологічними змінами в тканині печінки. Контрольну групу склали 10 хворих, яким проводилась лапароскопія в плановому порядку з приводу жовчокам'яної хвороби при відсутності гістологічних змін в тканині печінки.

Функціональну активність геному соматичних клітин встановлювали за показниками каріограми інтерфазних ядер гепатоцитів. Забарвлення ядер здійснювали за Фольгеном в модифікації Л.Є. Ковальчук і співавторів (1994). Комплексний аналіз чотирьох індексів каріограми (хроматизації, ядерцевої, гетеропікнотичної Х-хромосоми, патологічно змінених ядер) проводили за методикою Л.Є. Ковальчук [15].

Статистичну обробку отриманих результатів проводили на IBM PC Pentium-200 з використанням стандартного пакету програми "Statistica 5.1 for Windows" ("Stat Soft", США).

#### Результати дослідження

У хворих на ХВГ та ЦП в 121 (54,3%) випадку було виявлено позапечінкові прояви у вигляді тривалої гарячки, артралгій та артритів, міалгій, нейропатій, геморагічних та алергічних висипань на шкірі, лімфаденопатії, анемії, синдромів Шегрена та Рейно. Вони спостерігалися у 67 (50,0%) хворих при HBV-інфекції, серед яких було 46 (80,7%) хворих на ХГВ у фазу реплікації, 11 (16,9%) на ХГВ у фазу інтеграції, 10 (83,3%) на HBV-ЦП. Позапечінкові прояви виявлені у 54 (60,7%) хворих при HCV-інфекції, серед яких були 38 (56,7%) хворих на ХГС і 16 (72,7%) на HCV-ЦП.

Проведені дослідження наявності аутоантител у 121 хворого на ХВГ з позапечінковими проявами виявили їх у 88 (76,0%) випадках. Відзначено, що у хворих на ХГВ аутоантитела спостерігалися в 42 (73,7%) з 57 випадків наявності позапечінкових проявів, тоді як у хворих на ХГС частота виявлення аутоантител була дещо більшою і складала 46 (85,2%) з 54 випадків. Виявлено, що у хворих на ХГВ ANA зустрічались в поєднанні з SMA в 12 (28,6%) випадках, SMA в поєднанні з AMA-в 5 (11,9%), самостійно ANA-в 7 (16,6%), SMA-в 16 (38,1%), LKM-1-в 2 (4,8%) випадках.

У хворих на ХГС LKM-1 зустрічались в 27 (58,7%) випадках, ANA в поєднанні з SMA-в 8 (17,4%), SMA в поєднанні з AMA-в 3 (6,5%), самостійно ANA- в 2 (4,3%), SMA-в 6 (12,0%) випадках. Титр виявлених аутоантител в основному був невисоким і складав 1:40, і тільки в 13 (10,7%) хворих

складав 1:80 і більше.

Встановлена особливість продукції аутоантител у хворих на ХВГ, яка полягала в тому, що у хворих на ХГВ виявлені в переважній більшості SMA та ANA, а у хворих на ХГС-LKM-1. Як відомо, наявність ANA та SMA характерно для АІГ I типу, а LKM-1-II типу [4, 13, 14, 33].

Клінічна картина хворих з ANA та SMA як при ХГВ, так і при ХГС в більшості (82,0%) випадків була характерною для активного гепатиту і проявлялась, крім гепатомегалії, інтоксикаційним, мезенхімально-запальним та цитолітичним синдромами. Активність трансаминаз була в них вищою від норми більш як в 3 рази, а показник Де Рітиса АсАТ/АлАТ-нижчим одиниці. В цих хворих відзначалось підвищення тимолової проби до  $(8,9 \pm 1,2)$  од ( $p < 0,05$ ), зменшення АГ-показника до  $0,86 \pm 0,05$  ( $p < 0,05$ ), збільшення вмісту IgG до  $(22,86 \pm 1,44)$  г/л ( $p < 0,05$ ).

У хворих з наявністю LKM-1 в більшості (74,2%) випадків відзначався латентний перебіг захворювання з нормальним або ж невисоким рівнем трансаминаз. В цю групу ввійшли 29 (93,5%) хворих на ХГС та 2 (6,5%) хворих на ХГВ. Ймовірно, що переважна продукція аутоантител LKM-1 під впливом HCV-інфекції виступала одним з чинників характерного латентного перебігу ХГС.

В клінічній картині 6 (75,0%) хворих на ХВГ з виявленими AMA переважали ознаки холестази, що проявлялося жовтяницею, свербіжем шкіри, розширенням внутрішньопечінкових жовчевих протоків за результатами УЗД, підвищенням активності ЛФ більш як в 2 рази ( $p < 0,05$ ). В цих хворих виявлено збільшення вмісту IgM до  $(3,42 \pm 0,29)$  г/л порівняно з  $(1,65 \pm 0,09)$  г/л в контролі ( $p < 0,05$ ). Як відомо, наявність в сироватці крові AMA (антитіл до антигенів внутрішньої поверхні мембрани мітохондрій) та холестази є характерними для ПБЦ [10, 22]. Можливо, вірусна HBV- та HCV-інфекція стимулювала розвиток ПБЦ або ж була супутньою в 4,8% випадків обстежених хворих.

У хворих на АХП в 14 (15,9%) випадках виявлені позапечінкові прояви, що проявлялися у вигляді недеформуючих артритів великих суглобів (6,5%) з вираженим больовим синдромом, артралгій (14,8%), міалгій (10,2%), лімфаденопатій (9,1%), геморагічного синдрому (6,8%), синдрому Рейно (6,8%), алергічних висипань на шкірі (5,7%). В 11 (12,5%) хворих відзначався гематологічний синдром у вигляді анемії.

Проведені дослідження виявили наявність аутоантител у 12 (13,6%) хворих на АХП-у 6 (15,0%) хворих на АГ і 6 (16,7%) на ЦП. В основному відзначалося поєднання SMA та ANA-в 5 (41,7%) хворих, SMA та AMA-в 2 (16,7%), самостійно SMA були виявлені в 3 (25,0%), ANA-в 2 (16,7%) хворих. Титр аутоантител у всіх хворих на АХП був невисоким і складав 1:40. Отже, в обстежених хворих на АХП виявлені аутоімунні порушення I типу.

У хворих на ХТГ за клінічним перебігом нами виділено 4 форми: асимптомну, холестатичну, аутоімунну і змішану, які з різною частотою відзначались в досліджуваних групах хворих (табл. 1).

Аутоімунна форма ХТГ у 7 (8,3%) обстежених хворих характеризувалась клінічними проявами запального та інтоксикаційного синдромів-

вираженою загальною слабкістю, субфебрилітетом, позапечінковими змінами у вигляді суглобового та геморагічного синдромів, підвищенням ШОЕ більше 24мм/год. Біохімічно аутоімунна форма ХТГ проявлялась розвитком мезенхімально-запального синдрому, про що свідчило підвищення тимолової проби до  $(8,2 \pm 0,7)$  од ( $p < 0,05$ ), зменшення А/Г-показника до  $0,78 \pm 0,05$  ( $p < 0,05$ ), збільшення вмісту IgM до  $(2,75 \pm 0,26)$  г/л ( $p < 0,05$ ) та IgG до  $(22,35 \pm 1,86)$  г/л ( $p < 0,05$ ). В цих хворих на ХТГ переважало збільшення активності АлАТ над АсАТ ( $p < 0,05$ ) і коефіцієнт Де Рітиса був менше одиниці, що вказувало на перевагу в них запального типу пошкодження печінкових клітин.

Аутоантитіла виявлені у 15 (17,9%) хворих на ХТГ-у 7 з них діагностовано аутоімунна форма, у 8-змішана. SMA виявлені в 13 (15,5%) хворих, ANA-в 12 (14,3%) хворих, причому в 10 (11,9%) хворих вони були виявлені в поєднанні LKM-1 та AMA в хворих на ХТГ не були виявлені. Титр аутоантитіл в 13 (15,5%) випадках був невисоким і складав 1:40, і лише у 2 (2,4%) випадках при активному перебігу ХТГ, індукованого хімічними чинниками, титр ANA та SMA був 1:80.

В клініці АІГ переважали прояви запального та інтоксикаційного характеру у вигляді гарячки, загальної слабкості, позапечінкових проявів, а в клініці ПБЦ-ознаки внутрішньопечінкового холестазу у вигляді свербіжу шкіри та жовтяниці, що є характерним для аутоімунних захворювань печінки [10, 33].

Серед позапечінкових проявів в обстежених хворих відзначались недеформуючі артрити великих суглобів з вираженим больовим синдромом (18,3%), артралгії (38,3%), міалгії (18,3%), лімфаденопатії (41,7%), міокардит (6,7%), геморагічний синдром (11,7%), алергічні висипання на шкірі (13,3%), вузлувата еритема (3,3%). У 2 (3,3%) випадках розвинулась клініка неспецифічного виразкового коліту. В 21 (35,0%) випадку відзначались гематологічні синдроми: анемія-у 19 (31,6%), лейкопенія-у 5 (8,3%), тромбоцитопенія-у 4 (6,7%). В сечі у 5 (8,3%) хворих виявлені зміни, характерні для дифузного гломерулонефриту.

При біохімічному обстеженні встановлено, що у хворих на АІГ переважали цитолітичний та мезенхімально-запальний синдроми, а у хворих на ПБЦ-холестатичний, причому вони відповідно були більш виражені, ніж при гепатитах іншої етіології. У хворих на АІГ переважало збільшення активності АлАТ над АсАТ і показник Де Рітиса складав  $0,69 \pm 0,04$ , тобто відзначався запальний характер цитолізу, тоді як у хворих на ПБЦ переважало збільшення активності АсАТ над АлАТ і показник Де Рітиса складав  $1,39 \pm 0,10$ , що вказувало на некротичний характер цитолізу гепатоцитів.

Виявлено, що при АІГ аутоантитіла частіше зустрічались в поєднанні ANA та SMA у 21 (50,0%) випадку, SMA та AMA в 3 (7,1%) випадках, самотньо SMA спостерігались у 8 (19,0%), ANA-в 5 (11,9%), LKM-1 - також в 5 (11,9%) випадках. У хворих на АІГ титр аутоантитіл складав 1:80. При ПБЦ у всіх випадках виявлялись AMA, в 4 (22,2%)-SMA, у 2 (11,1%)-ANA в поєднанні з AMA. У хворих на ПБЦ титр AMA складав 1:80 і більше, SMA та ANA-був невисоким і складав 1:40.

Серед 21 хворого з виявленими AMA у 18 (85,7%) в клінічній картині переважали ознаки внутрішньопечінкового холестазу, що проявлялось жовтяницею, свербіжем шкіри, розширенням внутрішньопечінкових жовчевих протоків за результатами УЗД, підвищенням активності ЛФ в 3,1 рази, ГГТП-в 6,4 ( $p < 0,05$ ) рази, збільшенням вмісту в крові холестерину-в 2,1 рази ( $p < 0,05$ ), тригліцеридів-в 4,0 ( $p < 0,05$ ),  $\beta$ -ліпопротеїдів-в 2,6 рази ( $p < 0,05$ ). У цих хворих, на відміну від інших захворювань печінки, переважало збільшення вмісту в крові IgM більш як в 2 рази порівняно з контролем ( $p < 0,05$ ). Відомо, що наявність в крові AMA та внутрішньопечінковий холестаз є характерними для ПБЦ [10, 32], які підтверджують його наявність в обстежених хворих.

При порівнянні частоти продукції аутоантитіл у хворих на хронічні гепатити (табл. 2) встановлено, що вона була стовідсотковою при аутоімунних захворюваннях печінки-АІГ та ПБЦ, високою-при ХГВ, особливо при ХГС, меншою-при ХТГ та АХП. При оцінці характеру продукції аутоантитіл встановлено, що при ХГВ, АІГ, ХТГ та АХП переважали антитіла, характерні для аутоімунних реакцій I типу-ANA та SMA, при ХГС-LKM-1, характерні для аутоімунних реакцій I типу, при ПБЦ-AMA.

Проведений порівняльний аналіз цитогенетичних характеристик гепатоцитів у хворих на хронічні гепатити різної етіології дозволив виявити в них патологічні зміни ядер-переважно вакуолізованих, з глибокими інвазіями каріолеми (фіг. 1), тощо, кількість яких збільшилася при АІГ, ХГВ, ХГС та АІГ в 1,7, 2,8, 3,2 та 3,3 рази відповідно проти  $7,01 \pm 0,26$  ( $p < 0,05$ ) в контролі. Встановлена пряма кореляція між кількістю патологічно змінених ядер та наявністю в крові аутоантитіл ( $k = +0,43$ ,  $p < 0,05$ ), що засвідчує взаємозв'язок між аутоімунними порушеннями та цитогенетичними змінами.

При вивченні трансмембранного глікопротеїну Fas/APO-1 (CD95) виявлено збільшення його експресії на лімфоцитах периферичної крові у 108 (72,5%) із 149 обстежених хворих. В середньому вона складала  $(5,90 \pm 0,21)\%$  порівняно з  $(1,56 \pm 0,23)\%$  ( $p < 0,05$ ) в контролі. Враховуючи, що для Fas/Fas-L системи не відомо інших функцій, крім індукції апоптозу [7, 28], отримані результати вказують на активацію апоптозу у хворих на хронічні гепатити. Збільшення експресії Fas/APO-1 (CD95) на лімфоцитах периферичної крові частіше відзначалось у хворих на ХГВ у фазу реплікації, ХГС та АІГ порівняно з хворими на АХП, ХТГ та ХГВ у фазу інтеграції (табл. 3).

В обстежених хворих на хронічні гепатити всіх груп виявлено достовірне збільшення вмісту  $\beta_2$ -МГ в сироватці крові (фіг. 2). В середньому він складав  $(4,69 \pm 0,16)$  мг/л порівняно з  $(2,87 \pm 0,06)$  мг/л в контролі ( $p < 0,05$ ).

Наступним етапом дослідження після клінічного, біохімічного та імунологічного обстеження хворих на хронічні гепатити було проведення багатofакторного регресійного аналізу та формування рівняння множинної регресії з метою виявлення залежності між розвитком аутоімунних реакцій та іншими попередньо обрахованими чинниками (табл. 4). До статистичної моделі включали лише

ті чинники, для яких рівень достовірності- $p < 0,05$ . Після проведеного багатофакторного регресійного аналізу нами отримано статистичну модель пропорційного впливу змін кожного чинника на залежний чинник-розвиток аутоімунних реакцій.

Проведений багатофакторний регресійний аналіз дав нам можливість визначити головні значимі чинники розвитку аутоімунних реакцій, до яких належать ЦІК > наявність в крові маркерів ХГС та ХГВ > збільшення експресії Fas/APO-1(CD95) на лімфоцитах периферичної крові > збільшення вмісту в крові  $\beta_2$ -МГ > збільшення кількості патологічно змінених ядер гепатоцитів.

**Висновки.** Таким чином, комплексне клініко-лабораторне і цитогенетичне обстеження хворих на хронічні гепатити різної етіології з визначенням наявності в крові маркерів ХГС та ХГВ, вмісту в крові циркулюючих імунних комплексів, бета<sub>2</sub>-мікроглобуліну, експресії Fas/APO-1(CD95) на лімфоцитах периферичної крові, кількості патологічно змінених ядер гепатоцитів дає можливість прогнозувати в них розвиток аутоімунних реакцій.

#### Література

- 1 Алгоритмы диагностики хронических вирусных гепатитов В и С и лечения больных // Доктор - 2001 - №2 - С 32-34
- 2 Алкогольная болезнь печени // Доктор - 2001 - №2 - С 36-42
- 3 Апоптоз и заболевания желудочно-кишечного тракта / Передерий В Г, Ткач С М, Кожевников А Н и соавт // Клін Фармація - 2001 - Т 5, №1 - С 10-13
- 4 Апросина З Г Аутоиммунный гепатит // Рос журн гастроэнтерол, гепатол, колонопроктол - 1998 - №5 - С 47-57
- 5 Аруин Л И Апоптоз и патология печени // Рос журн гастроэнтерол, гепатол - 1996 - №2 - с 6
- 6 Бабак О Я Хронические гепатиты - Киев "Блиц-Информ", 1999 - с 207
- 7 Белушкина Н Н, Северин С Е Молекулярные основы патологии апоптоза // Арх патол - 2001 - №1 - С 51-60
- 8 Буеверов А О Иммунологические механизмы повреждения печени // Рос журн гастроэнтерол, гепатол, колонопроктол - 1998 - №5 - С 18-21
- 9 Буеверов А О Лекарственные поражения печени // Рус мед журн - 2001 - №13-14 - С 608-610
- 10 Бурневич Э З, Крель П Е Современные представления об аутоиммунных холестатических поражениях печени // Клін медицина - 1999 - №9 - С 13-17
- 11 Галицкий В А Апоптоз гепатоцитов і патогенез вирусных гепатитов та их окремих ускладнень // Вирусные гепатиты с парентеральным механизмом передачи возбудителей и их исходы - Киев, 2001 - С 93-96
- 12 Дранник Г Н Клиническая иммунология и аллергология - Одесса, 1999 - с 603
- 13 Ивашкин В Т, Буеверов А О Аутоиммунные заболевания печени в практике клинициста - М-Вести, 2001 - с 102
- 14 Ивашкин В Т, Буеверов А О Аутоиммунный гепатит // Рос журн гастроэнтерол, гепатол,

колопроктол - 2001 - №2 - С 24-29

15 Ковальчук Л Є, Случик В М, Геращенко С Б Оцінка генетичного ефекту дві факторів хімічного виробництва // Цитопія і генетика - 1994 - Т 28, №3 - С 41-46

16 Майер К П Гепатит и последствия гепатита. Практ рук. Пер с нем / Под ред А А Шептулина - М Геотар медицина, 1999 - с 432

17 Мороз Л В Рівень медіаторів запалення та апоптозу у пацієнтів з хронічним вірусним мікст-гепатитом В та С // Вісник Вінницького держ мед університету - 2001 - №2 - С 495-498

18 Морфологическая диагностика заболеваний печени / Под ред В В Серова, К Лапиш - М Медицина, 1989 - с 128

19 Москаленко В Ф, Харченко Н В, Голубчиков М В Заболевания гепатобилиарной системы (распространенности, нерешенные проблемы) // Збірник наукових праць спів КМАПО ім П Л Шупика - 2000 - вип 9, КН 4 - С 5-10

20 Серов В В, Мухин Н А Иммунопатология хронических вирусных заболеваний печени // Вестн Рос АМН - 2000 - №11 - С 44-47

21 Харченко Н В Хронические гепатиты: достижения, нерешенные проблемы // Сучасна гастроентерол і гепатол - 2000 - №1 - С 50-54

22 Шерлок Ш, Дули Дж Заболевания печени и желчных путей // Практ Рук-во - М Геотар Медицина, 1999 - с 864

23 A P can den Berg Autoimmune hepatitis. Pathogenesis, diagnosis and treatment // Scand J of Gastroenterol - 1998 - Vol 33, No 225 - P 66-69

24 Cassani F, Cataleta M, Valentini P Serum autoantibodies in chronic hepatitis C. Comparison with autoimmune hepatitis and impact on the disease profile // Hepatol - 1997 - Vol 26, №3 - P 561-566

25 Fas antigen expression in liver tissues of patients with chronic hepatitis B / K Mochizuki, N Hayashi, N Hiramatsu et al // J Hepatol - 1996 - Vol 24, Nol - P 1-7

26 Gavin S Oxford Handbook of Clinical Immunology - Oxford, 1999 - 240p

27 Increase in CD95 (Fas/ APO-1)-positive CD4(+) and CD8(+) T cells in peripheral blood derived from patients with autoimmune hepatitis or chronic hepatitis C with autoimmune phenomena / S Ogawa, K Sakaguchi, A Takaki et al // J of Gastroenterol and Hepatol - 2000 - Vol 15, №1 - P 69-75

28 In situ investigation of Fas/FasL expression in chronic hepatitis B infection and related liver diseases / K X Luo, Y F Zhu, L X Zhang et al // J Viral Hepatol - 1997 - Vol 4, №5 - P 303-307

29 Increased beta2-microglobulin-free HLA class I heavy chain serum levels in the course of immune responses to viral antigens and to mismatched HLA antigens / F Puppo, S Brenci, P Contini et al // Tissue Antigens - 2000 - Vol 55, №4 - P 333-341

30 Increased serum concentrations of soluble HLA-class I antigens in hepatitis C virus related mixed cryoglobulinaemia / S Migliaresi, A Bresciani, L Ambrosone et al // Ann Rheum Dis - 2000 - Vol 59, №1 - P 20-25

31 Infiltrating polymorphonuclear leudocytes and apoptotic bodies derived from hepatocytes but not from ballooning hepanocytes containing Mallory

bodies show nuclear DNA fragmentation in Alcoholic hepatitis / T Takahashi, T So-Wan, T Kamimura et al // Alcohol Clin Exp Res-2000 - Vol 24, №4 - P 68-73

32 Kaplan M M Primary biliary cirrhosis // N Engl J Med -1996 - Vol 355 - P 1570-1580

33 Meyer zum Buschenfelde K H, Dienes H P Autoimmune hepatitis // Virchows Arch 1996 Vol 429 P 1-12

34 Mita E, Hayashi N Apoptosis in human diseases role of Fas system in liver cell injury by viral hepatitis // Rinsho Byori- 1997 - Vol 45, №5 - P 477-482

35 Obermayer-Straub P, Strassburg C P, Manns M P Autoimmune hepatitis // J Hepatol - 2000 - Vol 32, №1 -P 181-197

36 Rheumatologic and autoimmune manifestations in patients with chronic hepatitis C

virus infection / M Romero Portales, A De Diego Lorenzo, J Rivera, et al // Rev Esp Enferm Dig - 1997 - Vol 89 - P 591-598

37 Siegel E M, Fleisher T A The role of Fas and related death receptors in autoimmune and other disease states // J Allergy Clin Immunol-1999 - Vol 103, №5 -P 729-738

38 Simonovic J, Dokic L J, Svirlih N Autoimmune hepatitis and/or hepatitis C // Srp Arh Celok Lek -1999 -Vol 127, №3-4 - P 109-113

39 Strassburg C P, Obermayer-Straub P, Manns M P Autoimmunity in hepatitis C and D virus infection // J Viral Hepat -1996 - Vol 3, №2 - P 49-59

40 Zauli D, Cassani F, Bianchi F B Auto-antibodies in hepatitis C // Biomed Pharmacother - 1999 - Vol 53, №5-6 -P 234-241

Таблиця 1

Частота клінічних форм хронічного токсичного гепатиту в залежності від етіології

Форма ХТГ	Хімічний, n=28		Медикаментозний, n=56			
			НПЗП, n=27		сульфаніаміди, n=29	
	Абс	%	Абс	%	Абс	%
Асимптомна	7	25,0	11	40,7	9	31,0
Холестатична	17	60,7	8	29,6	15	51,7
Автоімунна	2	7,1	3	11,1	2	6,9
Змішана	2	7,1	5	18,5	3	10,3

Таблиця 2

Порівняльна характеристика наявності аутоантител в крові хворих на хронічні гепатити різної етіології

Антитіла	ХГВ і НВВ-ЦП, n=134		ХГС НСВ-ЦП, n=89		АХП, n=88		ХТГ і ЦП, n=84		АІГ, n=42		ПБЦ, n=18		Всього, n=455	
	Абс	%	Абс	%	Абс	%	Абс	%	Абс	%	Абс	%	Абс	%
ANA	7	16,6	2	4,3	2	16,7	2	13,3	5	11,9	-	-	18	10,3
SMA	16	38,1	6	13,0	3	25,0	3	20,0	8	19,0	-	-	36	20,6
LKM-1	2	4,8	27	58,7	-	-	-	-	5	11,9	-	-	34	19,4
AMA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12	66,7	12	6,9
ANA+ SMA	12	28,6	8	17,4	5	41,7	10	66,7	21	50,0	-	-	56	32,0
SMA+ AMA	5	11,9	3	6,5	2	16,7	-	-	3	7,1	4	22,2	17	9,7
ANA+AMA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	11,1	2	1,1
Всього	42	31,3	46	51,7	12	13,6	15	17,9	42	100,0	18	100,0	175	38,5

Примітки ANA-антиядерні антитіла,  
SMA-антигладком'язові антитіла,  
LKM-1-антитіла до мікрсом печінки/нирок,  
AMA-антимитохондріальні антитіла

Таблиця 3

Порівняльна характеристика експресії Fas/APO-1 (CD95) на лімфоцитах периферичної крові у хворих на хронічні гепатити в залежності від етіології

Групи хворих	Частота збільшення експресії CD95+ на лімфоцитах крові		Відносна кількість CD95+ лімфоцитів у крові (%)	p
	абс	%		
ХГВ, фаза реплікації, n=27	25	92,6	6,93±0,41	p <sub>1356</sub> < 0,05
ХГВ, фаза інтеграції, n=12	4	33,3	3,23±0,30	p <sub>12467</sub> < 0,05
ХГС, n=33	28	84,8	7,40±0,24	p <sub>1356</sub> < 0,05

Продовження таблиці 3

Порівняльна характеристика експресії Fas/APO-1 (CD95) на лімфоцитах периферичної крові у хворих на хронічні гепатити в залежності від етіології

Групи хворих	Частота збільшення експресії CD95+ на лімфоцитах крові		Відносна кількість CD95+ лімфоцитів у крові (%)	p
	абс	%		
АХП, n=49	32	65,3	4,45±0,32	p <sub>1 2 4 7</sub> < 0,05
ХТГ, n=14	8	57,1	5,29±0,35	p <sub>1 2 3 4 7</sub> < 0,05
АІГ, n=14	11	78,6	6,29±0,40	p <sub>1 3 5 6</sub> < 0,05
Контроль, n=10	-	-	1,56 ±0,23	-

Примітки

- p<sub>1</sub>-відмінність від контролю,
- p<sub>2</sub>-відмінність від ХГВ у фазу реплікації,
- p<sub>3</sub>-відмінність від ХГВ у фазу інтеграції,
- p<sub>4</sub>-відмінність від ХГС,
- p<sub>5</sub>-відмінність від АХП,
- p<sub>6</sub>-відмінність від ХТГ,
- p<sub>7</sub>-відмінність від АІГ

Таблиця 4

Багатофакторний регресійний аналіз для залежного чинника аутоімунних реакцій у хворих на хронічні гепатити (n=83)

R = 0,545788, F (1,62) = 25,45,		R <sup>2</sup> = 0,297885, P<0,00046		Приведений R <sup>2</sup> =0,286183 Стандартна похибка оцінки 0,2581	
Чинники аналізу	БЕТА	Стандартна похибка для БЕТА	B	Стандартна похибка для B	p
Інтерсепта			1,2039	0,0646	0,0012
ЦІК	0,647762	0,098463	0,2275	0,0346	0,0001
Маркери ХВГ В і С	0,551489	0,116809	0,0412	0,0087	0,0001
Fas/APO-1(CD95) на лімфоцитах	0,486232	0,122373	3,6613	0,9218	0,0002
вміст β <sub>2</sub> -МГ в крові	0,439652	0,125818	1,2630	0,3620	0,0010
Патологічні ядра гепатоцитів	0,423217	0,100670	0,0002	0,0047	0,0001

Примітки

- 1 Інтерсепта-оцінка загального коефіцієнта множинної регресії B
- 2 БЕТА-стандартизований коефіцієнт множинної регресії
- 3 B-нестандартизований коефіцієнт множинної регресії
- 4 R-коефіцієнт множинної кореляції
- 5 R<sup>2</sup>-коефіцієнт множинної детермінації
- 6 Приведений R<sup>2</sup>-відношення R<sup>2</sup> до його похибки
- 7 F-коефіцієнт Фішера
- 8 p-рівень достовірності

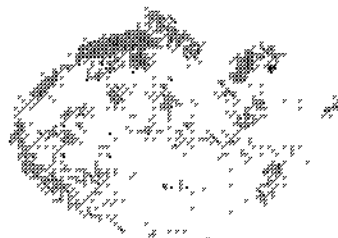


Рис. 1

Рівень гепатоцитів у хворих на хронічний гепатит В  
 "глибок інвазія" та порушення цілісності капілярів  
 Забарвлення за Фолгаріном в модифікації Ковальчук, 3Е у 90С

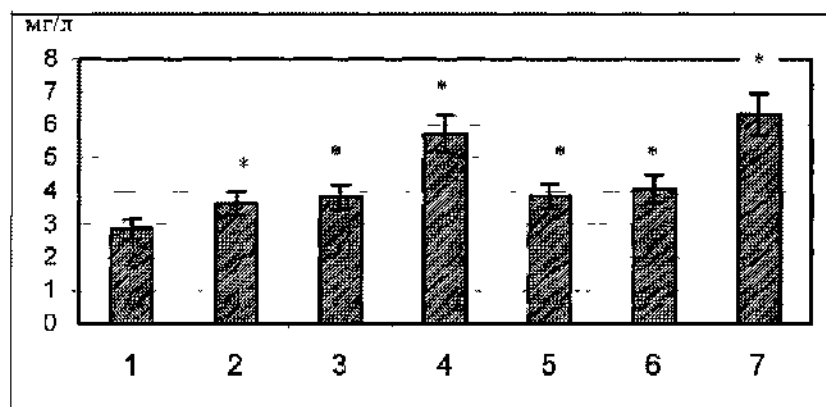


Рис. 2

Рівень бета-2 мікроглобуліну ( МГ) в сироватці крові хворих на хронічні гепатити  
 Примітки: 1 - контроль 2 - АГ 3 - ХГ 4 - ХГВ у фазу реплікації,  
 5 - ХГВ у фазу інтеграції 6 - ХГС 7 - АІГ  
 \* - достовірність відмінності від контролю:  $p < 0.05$