

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

CLINICAL MANIFESTATIONS OF VIRUS HEPATITIS A IN CHILDREN WHO LIVE IN ECOLOGICALLY UNFAVORABLE CONDITIONS FOR A LONG TIME

E.Ya. Khalilov, A.V. Bobryshova, O.S. Chernyayeva, I.Yu. Maslova, L.I. Prokudina, A.E. Chytakova

SUMMARY. 95 children with virus hepatitis A (VHA) were under the observation. The spent exami-

nations have shown, that the VHA course in children, who lived in ecologically unfavorable conditions for a long time, has a considerable originality and is characterized, first of all, by that the clinical pattern of VHA at them is expressed more brightly, is submitted mostly by mild-severe, quite often by relapsing forms of the illness with long convalescence.

© Бондаренко А.М., Єгорова М.В., 2004
УДК 616.36-002.2:612.017.1]-055-02:178.8:615.212.7

А.М. Бондаренко, М.В. Єгорова

ВПЛИВ ОПІАТИВ НА КЛІТИННУ ЛАНКУ ІМУННОЇ СИСТЕМИ УХВОРИХ НА ВІРУСНІ ГЕПАТИТИ НАРКОСПОЖИВАЧІВ І КЛІНІЧНО ЗДОРОВИХ ОСІБ

Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського АМН України

Наведено експериментальні дані впливу різних концентрацій сурогатів опію та морфіну на життєздатність і функціональну активність мононуклеарів периферичної крові хворих на парентеральні вірусні гепатити (ВГ) та здорових людей. Показано імуносупресивний вплив опіатів і високу токсичність сурогатів опію для імуніцитів, а також високу толерантність лімфоцитів наркоспоживачів до цитотоксичної та імуносупресивної дії морфіну.

Частка наркоспоживачів у структурі парентеральних вірусних гепатитів неухильно зростає та вже досягає 60-80 % [1-3]. ВГ разом з ВІЛ-інфекцією стають маркером наркоспоживання. Парентеральне вживання наркотиків, як правило, припускає формування фізичної та психологічної залежності [4, 5], що призводить до включення наркотику та його «глибокого проникнення» у метаболізм і регуляцію гомеокінезу макроорганізму. Відомо, що опіати впливають практично на всі системи макроорганізму [4, 5] та як нейромедіатори відіграють роль цитокінів, забезпечуючи взаємодію нейроендокринної системи з імунною та системою інтерферонів [5]. Більшість дослідників вказує на імуносупресивний вплив як ендогенних, так і екзогенних опіатів [2, 3, 6, 7].

Імунна система відіграє провідну роль у патогенезі парентеральних ВГ, визначаючи ступінь

тяжкості, циклічність і наслідки ВГ [2, 3]. Механізми імунної регуляції цитолізу при ВГ багатокомпонентні та складні, а при ВГ у наркоспоживачів взагалі не вивчені. Крім цього, робіт з вивчення прямого впливу опіатів на імуніцити у наркозалежних хворих на ВГ у доступній літературі також немає. Тому основною метою роботи було вивчення прямого впливу опіатів на імуніцити, їх функціональну активність і пояснення деяких особливостей патогенезу та клініки ВГ у наркоспоживачів.

Матеріали і методи

Обстежено 45 наркозалежних хворих з парентеральними ВГ (основна група), 30 хворих на ВГ, які не споживали наркотиків (контрольна група), і 25 клінічно здорових осіб (донори). Вік обстежених становив 18-40 років. В основній і контрольній групах всі обстежені були чоловіками. У групу донорів увійшла 1 вагітна жінка (термін вагітності 30 тижнів). Основну та контрольну групу становили хворі на парентеральні моно- та мікст-гепатити (В, С, В+С, В+D, В+С+D) з тяжким (20 %), середньотяжким (60 %) і легким ступенем (20 %). Обидві групи були репрезентативними за основними параметрами.

У межах діючого законодавства в якості опіатів використані залишки «сурогатів опію» та морфіну гідрохлориду (до 0,1 мл), залишені наркоспоживачами у викинутих пластикових шприцах та ампулах від фармакологічних препаратів одразу після введення наркотиків.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Як об'єкт дослідження використані мононуклеари, виділені з венозної крові на градієнті щільності ($\rho=1,077 \text{ г/см}^3$) [8]. У 0,1 мл похідної суспензії клітин у середовищі 199 (2×10^6 /мл) додавали рівну за об'ємом кількість досліджуваного опіату (сурогату опію або морфіну) у різних розведеннях від 1:10 до 1:100 000 від похідних. Суспензію інкубували при 37 °С протягом 60 хв, після цього центрифугували при 1000 об./хв протягом 15 хв. Для оцінки токсичного впливу різних концентрацій опіатів на мононуклеари вивчали їх життєздатність. Суспензію суправітально фарбували 0,1 % розчином трипанового синього (забарвлює нежиттєздатні лейкоцити) [8]. У камері Горяєва підраховували пофарбовані клітини та розраховували рівень нежиттєздатних лейкоцитів.

Оцінювали також вплив опіатів на презентацію рецепторів на Т-лімфоцитах. Для цього була створена модель, яка базувалась на методі виявлення індивідуальної чутливості Т-клітин до імуномодуляторів [8] за рахунок здатності Т-клітин під дією імуномодуляторів змінювати на мембрані презентацію рецепторів до еритроцитів барана. У моделі замість імуномодулятора в середовище інкубації додавали опіати. Концентрація опіатів була підібрана з розрахунком їх впливу на життєздатність мононуклеарів таким чином, щоб рівень клітин, які загинули, не перевищував 5 %, що було однією з основних і необхідних умов базової методики [8]. Для моделі були використані дані, отримані при вивченні впливу опіатів на життєздатність мононуклеарів.

Результати обробляли за допомогою методів варіаційної математичної статистики. Вірогідність різниці порівнюваних показників оцінювали за критерієм Стьюдента. Для обробки використані пакети програм *Microsoft Excel (MS Office 2000)* та *Statgrafics for Windows*.

Результати досліджень та їх обговорення

Зважаючи на те, що більшість наркоспоживачів використовують сурогати опію, для максимального наближення умов експерименту до реальних, на першому етапі необхідно було вивчити вплив на імуніцити саме опійних сурогатів. Кустарно виготовлені препарати опію екстрагуються з первинної сировини органічними розчинниками з подальшою хімічною модифікацією оцтовим ангідридом з метою отримання діацетилморфіну (героїну) [4] і більшість «виробників» опійних сурогатів в нашому регіоні дотримується цієї схеми. Тому з певною ймовірністю можна було розраховувати на деяку «стандартизацію» цих опіатів. Слід також вказати, що в останній час є багато випадків додавання до сурогатів опію виробниками та постачальниками наркотиків домішок, які посилюють психотропний ефект наркотика (антигістамінні препарати, ефедрин та ін.).

В експерименті використані окремі зразки сурогатів опію. Для оцінки токсичності їх різноманітних проб, а також для виключення імовірного впливу окремого високотоксичного зразка на інші проби сурогатів опію, отримані зразки цілеспрямовано не змішували в один пул. У проведеному дослідженні вивчення впливу сурогатів опію на мононуклеари периферичної крові хворих на ВГ і донорів чітко простежувались дві тенденції: залежність токсичності від зразка наркотика та його концентрації в культуральному середовищі. Виявилось, що навіть в достатньо високих розведеннях 1:10 000 (0,5 мкг/мл) і 1:100 000 (0,05 мкг/мл) сурогати опію були високотоксичними для імуніцитів. Рівень нежиттєздатних клітин після інкубації з сурогатами опію в цих розведеннях коливався в достатньо широких межах – від 10 до 65 %. Такий широкий діапазон коливання показників не давав можливості для статистичного аналізу й отримання достовірних даних. Зі збільшенням концентрації сурогату в середовищі інкубації логічно збільшувалась і його токсичність. Однак ступінь токсичності жорстко залежав тільки від досліджуваного зразка опіату, що також не дозволяло провести вірогідну статистичну обробку даних.

Для ілюстрації необхідно навести дані з терапевтичної, токсичної та летальної концентрацій морфіну в плазмі крові людини, які відповідно становлять 0,08-0,12; 0,15-0,5 та 0,5-4,0 мкг/мл [4]. Та якщо умовно порівняти за вмістом морфіну 1 мл сурогатного опіату до 1 мл 1 % розчину морфіну гідрохлориду та відповідно прийняти розведення сурогату 1:10 000 за «летальне» і 1:100 000 – за «терапевтичне», можна відзначити, що сурогати опію в цілому виявились значно токсичнішими, ніж чистий морфін. Необхідно також вказати, що, незважаючи на неможливість статистичної обробки отриманих даних з токсичності окремих зразків сурогатів опію, їх токсичність була вищою для групи осіб, що не вживала наркотиків, порівняно з наркоспоживачами. Однак і цей показник був досить варіабельним.

Отримавши дані про високу токсичність сурогатів опію та попередні дані про вищу толерантність імуніцитів наркоспоживачів до опіатів порівняно з хворими контрольної групи та донорами, на наступному етапі досліджень необхідно було вивчити вплив на життєздатність мононуклеарів основного компоненту сурогатів опію – фармакологічного морфіну, а також вивчити його імуномодулювальну дію на імуніцити. Дані залежності цитотоксичності морфіну від його концентрації в середовищі інкубації мононуклеарів наведені в таблиці 1.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Таблиця 1

Ступінь цитотоксичності морфіну для мононуклеарів периферичної крові у хворих на ВГ та клінічно здорових осіб ($M \pm m$)

Кінцева концентрація морфіну в середовищі інкубації, мкг/мл	Відсоток нежиттєздатних мононуклеарів після інкубації з морфіном, %		
	Хворі на ВГ, які вживали наркотики	Хворі на ВГ, які не вживали наркотики	Донори
500	66,18±3,12√	67,07±4,62√	68,07±2,60√
100	47,07±3,65*,√	57,07±4,46√	57,73±3,15√
50	43,53±3,72	50,53±3,27	50,20±2,31√
10	40,07±2,46√	46,47±3,13√	44,13±3,16√
5	31,73±2,40*,√	40,07±2,34√	39,47±2,69√
0,5	14,53±3,07*,√	28,87±3,50*,√,√√	25,07±2,55√
0,1	4,27±0,71	6,47±0,74√	6,20±0,68√
0,05	3,87±0,83	5,27±1,03	4,07±0,96
Контроль токсичності середовища та умов інкубації	3,47±0,92	3,53±0,91	3,20±0,86

Примітки (тут і далі): * – достовірна різниця порівняно з групою донорів ($P < 0,05$); √ – з контролем ($P < 0,05$).

Аналіз показав, що незалежно від групи пацієнтів цитотоксичність морфіну для мононуклеарів збільшується з ростом його концентрації в середовищі інкубації імуніцитів. Залежність має складний нелінійний характер. У концентраціях 0,05 і 0,1 мкг/мл, які відповідають «терапевтичному» рівню морфіну у сироватці крові, морфін практично не мав цитотоксичності. Тільки у хворих на ВГ, які не вживали наркотиків, та у донорів рівень нежиттєздатних клітин при концентрації морфіну 0,1 мкг/мл незначно перевищив 5 % бар'єр, а у наркоспоживачів він не досягав 5 % і був достовірно нижчим від показників у звичайних хворих на ВГ.

Рівень загиблих імуніцитів ставав значущим вже з «токсичної» концентрації (0,5 мкг/мл) в усіх групах обстежених і дорівнював вже 14-28 %. Слід відзначити, що, починаючи з концентрації морфіну 0,5 мкг/мл, відзначені достовірні відмінності у рівні загиблих мононуклеарів між групами. Так, у наркоспоживачів цей показник був у 2 рази нижчим, порівняно зі звичайними хворими на ВГ і донорами. З ростом концентрації морфіну в культуральному середовищі достовірність розбіжності між зазначеними групами зберігалась, але була менш значною, а при рівні морфіну 500 мкг/мл рівень нежиттєздатних клітин становив майже 70 % і вже достовірно не відрізнявся між групами. Необхідно також відзначити, що вірогідних відмінностей в рівні нежиттєздатних імуніцитів у випадках інкубації клітин при однакових концентраціях морфіну в групі донорів і хворих на ВГ, які не вживали наркотиків, не відзначено. Отримані дані чітко ілюструють те, що стійкість

мононуклеарів у наркоспоживачів до цитотоксичної дії високих концентрацій морфіну достовірно вища, ніж в осіб, що не вживають наркотиків.

Наступним етапом досліджень було вивчення імунотулювальності дії морфіну. Була використана концентрація морфіну в культуральному середовищі 0,1 мкг/мл, яка не мала цитотоксичного ефекту та була граничною між «терапевтичною» і «токсичною». В разі застосування вищих доз морфіну заздалегідь можна було очікувати зниження рецепторної презентації на мононуклеарах за рахунок високого рівня нежиттєздатних клітин. Застосування саме такої концентрації морфіну для осіб, які не вживали наркотиків, у вивченні імунотулювальності в досліджуваних групах і толерантність наркоспоживачів до високих доз опіатів, робило оптимальним і репрезентативним використання в методиці морфіну в дозі 0,1 мкг/мл. Вона задовольняла основну вимогу методу щодо вивчення імунотулювальних властивостей різних препаратів – використання нетоксичних терапевтичних їх концентрацій, аналогічних до тих, що утворюються в тканинах при введенні цих препаратів у разових терапевтичних або добових дозах. Крім цього, цей метод припускає використання пулу мононуклеарів з рівнем нежиттєздатних клітин, який не перевищує 5-6 % [8]. Цій умові і відповідали дані попереднього етапу дослідження концентрації морфіну 0,1 мкг/мл. Дані про вплив морфіну на презентацію мембранних рецепторів Т-клітинами в досліджуваних групах і у донорів наведені в таблиці 2.

В усіх групах інкубація Т-клітин з морфіном призводила до достовірного зниження рівня розет-

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Таблиця 2

Вплив морфіну на рівень презентації рецепторів на мононуклеарах периферичної крові хворих на ВГ та донорів (M±m)

Група	Рівень Е-РУК, %	Рівень Е-РУК з морфіном, %	Індекс чутливості, %
Хворі на ВГ, які вживали наркотики (n=25)	52,36±3,73*,√	44,88±3,56*	-14,28±2,97√,√√
Хворі на ВГ, які не вживали наркотики (n=20)	55,81±2,31*	41,68±2,43*,**	-25,33±2,27√
Клінічно здорові особи (n=25)	57,36±2,23*,√	41,02±1,63*	-27,07±2,83√√

коутворювальних клітин (Е-РУК), а отже – до зниження експресії мембранних рецепторів до еритроцитів барана. Але вірогідних відмінностей між групами в рівні Е-РУК як до, так і після інкубації з морфіном не визначено. Враховуючи це, необхідно було вивчити ступінь зниження рівня Е-РУК, який можна оцінити, розрахувавши індекс чутливості до імуномодулятора, який дорівнює відсотковому співвідношенню рівня Е-РУК після інкубації з імуномодулятором щодо рівня Е-РУК при інкубації без нього [8]. Виявилось, що у хворих на ВГ, які не вживали наркотиків, і донорів ступінь зниження дорівнював 25-27 %, а у наркоспоживачів був достовірно нижчим – майже в 2 рази (12-16 %). Наведені дані ілюструють імуносупресивний вплив морфіну в усіх групах. Однак, як і в разі вивчення цитотоксичності високих концентрацій морфіну, імуноцити наркоспоживачів виявились стійкішими до імуносупресивного впливу морфіну.

Отримані дані показали, що опіати в цілому мають імуносупресивний вплив на Т-клітинну ланку імунної системи та можуть проявляти пряму токсичність відносно мононуклеарів, що безпосередньо залежить від їх концентрації у середовищі інкубації та тканинах макроорганізму, а також від толерантності до наркотиків у наркоспоживачів. Необхідно особливо відзначити, що у наркозалежних хворих стійкість імуноцитів до токсичної дії опіатів у 2 рази вища, ніж у здорових осіб.

Механізм імуносупресії опіатів при ВГ можна пояснити їх прямим токсичним впливом на імуноцити. У першу чергу це стосується сурогатів опію. Останні високотоксичні, однак ступінь їх токсичності вкрай варіабельний і скоріше залежить не стільки від концентрації морфіну та героїну, як від токсичності домішок у сурогатному наркотичному. Інкубація мононуклеарів у середовищі з «терапевтичними» концентраціями чистого морфіну також знижувала рівень презентації рецепторів на мембрані лімфоцитів, а отже – призводила до зниження функціо-

нальної активності імуноцитів та їх потенції у міжклітинній взаємодії та кооперації. Тому можна з упевненістю стверджувати, що механізми імуносупресії опіатів реалізуються за рахунок як їх прямої цитотоксичності, так і здатності пригнічувати функціональну активність мононуклеарів. Отримані дані також не суперечать даним літератури [2, 3, 6, 7]. Однак дослідники, показавши імуносупресію морфіну, використовували його в експериментах на культурах мононуклеарів здорових осіб в цитотоксичній концентрації [6, 7], що одразу визначало механізм імуносупресії. Але це не було відображено у публікаціях і отже не могло бути вірогідним, а також слугувати достатньою умовою для інтерполяції цих даних на групу наркоспоживачів з ВГ з підвищеною толерантністю до цитотоксичності опіатів.

Необхідною умовою підтвердження імуносупресивного впливу опіатів у наркоспоживачів з ВГ було клінічне підтвердження експериментальних даних. Таким обґрунтуванням стала абстиненція, яка негативно впливає на перебіг ВГ у наркоспоживачів [1]. Припинення абстиненції застосуванням замісної терапії опіатами або агоністами опіатних рецепторів приводить до швидкого зворотного розвитку клінічного погіршення ВГ, що розвивається на фоні абстиненції [1]. Зростання ступеня тяжкості при ВГ безпосередньо пов'язане з активацією цитолізу, зумовленого імунним лізисом гепатоцитів і прямою токсичною дією сурогатів опію. При абстиненції токсичного фактору активації цитолізу немає і він зумовлений саме активацією імунного лізису гепатоцитів, що, швидше за все, пов'язано зі скасуванням опіатної імуносупресії. Підтвердженням цього може бути ефективність застосування глюкокортикоїдів у терапії ВГ на тлі абстиненції. Логічним стає висновок: скасування наркотичного відповідає скасуванню імуносупресії. Відповідно, опіати і є тим імунодепресантом, скасування якого активує цитоліз. Додатковим підтвердженням імуносупресії опіатів були і власні

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

клінічні спостереження. Так, гнійно-запальні процеси у наркоспоживачів перебігають з помірною інтоксикацією і вираженою тенденцією до локалізації. У таких осіб системна імунна відповідь, зумовлена лімфоцитами, ніби загальмована.

Отримані дані дозволили експериментально та клінічно проілюструвати імуносупресивну дію опіатів і пояснити окремі механізми цієї імуносупресії. Важливим результатом для клінічної практики в терапії хворих на ВГ наркоспоживачів стало патогенетичне обґрунтування негативного впливу абстиненції на перебіг ВГ за рахунок зняття імуносупресії опіатів, а отже необхідність відновлення імуносупресії за рахунок застосування глюкокортикоїдів або замісної терапії агоністами опіатних рецепторів.

Висновки

1. Сурогати опію високотоксичні для імуноцитів, а, отже, мають виражені імунодепресивні властивості.

2. Цитотоксичність морфіну для імуноцитів залежить від його рівня в середовищі інкубації клітин і зростає зі збільшенням його концентрації.

3. «Терапевтичні» концентрації морфіну (нижче 0,1 мкг/мл) не впливають на життєдіяльність мононуклеарів периферичної крові людини.

4. Механізмом імуносупресії морфіну є зниження презентації мембранних рецепторів на Т-лімфоцитах і цитотоксичність високих концентрацій морфіну для імуноцитів (у наркоспоживачів).

5. Наркоспоживачі порівняно з особами, що не вживають наркотики, мають вищу толерантність до цитотоксичної та імуносупресивної дії морфіну і сурогатів опію на імуноцити.

Література

1. Бондаренко А.М. Перебіг парентеральних вірусних гепатитів на тлі абстиненції у наркозалежних хворих // Інфекційні хвороби. – № 3. – 2003. – С. 20-23.

2. Жмуровская Л.С. Клинико-иммунологические особенности и исходы гепатитов В, С и В+С у больных наркоманией: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Санкт-Петербург, 2001. – 23 с.

3. Иванова Г.Ф. Клинико-иммунологические особенности и исходы гепатитов В, С и В+С у больных наркоманией: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Минск, 2002. – 23 с.

4. Веселовская Н.В., Коваленко А.Е. Наркотики. – М.: Триада-Х, 2000. – 206 с.

5. Клиническая токсикология детей и подростков: В 2-х т. / Под ред. И.В. Марковой, В.В. Афанасьева, Э.К. Цыбулькина, М.В. Неженцева. – СПб.: Интермедика, 1998. – Т. 1. – 304 с.

6. Сергеева М.Г., Гришина З.В., Варфоломеев С.Д. Модуляция пролиферации лимфоцитов периферической крови и трансформированных лимфоидных клеток человека морфином // Иммунология. – 1992. – № 6. – С. 63-64.

7. Сергеева М.Г., Гришина З.В., Варфоломеев С.Д. Механизм влияния морфина на пролиферацию лимфоцитов человека // Там же. – 1995. – № 5. – С. 35-38.

8. Унифицированные иммунологические методы обследования больных на стационарном и амбулаторном этапах лечения: Метод. рекомендации / Чернушенко Е.Ф., Бордонос В.Г., Голлинг Э.В., Дранник Г.Н. и др. – К., 1988. – 18 с.

INFLUENCE OF OPIMUM AND MORPHINE SUBSTITUTES ON VIABILITY AND FUNCTIONAL ACTIVITY OF THE MONONUCLEAR CELLS OF PERIPHERAL BLOOD OF THE PATIENTS WITH PARENTERAL VIRAL HEPATITIS AND HEALTHY PERSONS

A.M. Bondarenko, M.V. Yegorova

SUMMARY. The experimental data on the influence of various concentration of opium and morphine substitutes on viability and functional activity of the mononuclear cells of peripheral blood of the patients with parenteral viral hepatitis and healthy persons are presented. The immune suppression influence of opium derivatives and high toxicity of opium substitutes for immune cells as well as high tolerance of narcomaniac lymphocytes to cytotoxic and immune suppression action of morphine are shown.