

О. Б. Жукова, Н. В. Рязанцева, В. В. Новицкий, М. Ф. Никонова,
Т. Т. Радзивил, О. Е. Чечина

МОДУЛЯЦИЯ АПОПТОЗА ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ КАК СПОСОБ ВЫЖИВАНИЯ ВИРУСА ГЕПАТИТА С*

ГОУ ВПО "Сибирский государственный медицинский университет МЗ и СР РФ", Томск, ГНЦ
— Институт иммунологии МЗ и СР РФ, Москва

Хронический гепатит С сопровождается нарушениями реализации апоптоза лимфоцитов периферической крови. У пациентов с длительной персистенцией вируса гепатита С апоптотическая предрасположенность лимфоцитов периферической крови повышена. При культивировании стимулированных фитогемагглютинином лимфоцитов у больных хроническим гепатитом С в течение 18 ч отмечена ингибция апоптотической реакции как в общей лимфоцитарной фракции, так и среди CD4⁺-лимфоцитов крови. Предполагается вирусспецифическое воздействие на механизмы регуляции апоптоза клеток-мишеней.

Chronic hepatitis C (HCC) is accompanied by affected apoptosis of peripheral-blood lymphocytes. In patients with a durable persistence of hepatitis C virus (HCV) the apoptotic predetermination of peripheral-blood lymphocytes is higher. The apoptotic reaction was found to be inhibited both in general lymphocyte fraction and among CD4⁺ blood lymphocytes when phytohemagglutinin-stimulated lymphocytes were cultivated in patients with HCC for as long as 18 hours. Presumably, the apoptosis-regulation mechanisms of target cells experience a virus-specific impact.

Регуляция процесса клеточной гибели в норме и при патологии является одной из центральных проблем медико-биологической науки и интенсивно изучается сейчас во всем мире. Широкое внедрение термина "апоптоз", а главное связанных с ним понятий перевернуло сложившиеся годами представления о динамическом равновесии в организме. Под апоптозом понимают регулируемую активную форму гибели клеток (программированная клеточная смерть) с характерными морфологическими и биохимическими признаками, которая развивается как ответ на действие определенных экзогенных или эндогенных сигналов и проявляется глубоким нарушением энергетики клетки, деградацией ДНК и вследствие этого потерей клеточной части генетического материала. Основная

функция апоптоза заключается в уравнивании эффекта клеточной пролиферации, в элиминации поврежденных, старых и инфицированных клеток.

Апоптоз является фундаментальным процессом регулирования иммунной системы. С помощью этого механизма выбраковываются аутоспецифические клетки, реализуется клеточно-опосредованный цитолиз, участвуют лимфоциты, выполнившие свои иммунные функции [9]. В последнее время стало ясно, что с позиции апоптоза можно объяснить развитие многих заболеваний человека, поскольку и ослабление, и неадекватное усиление его ведут к патологическим изменениям органов и тканей [1, 9].

Установлено, что персистирующие вирусы для обеспечения собственного выживания способны изменять соотношение между постовым и апоптотическим потенциалом иммунокомпетентных клеток [13]. Вирус гепатита С (HCV) является ярким представителем инфектогенов, способных длительно персистировать в организме человека и индуциро-

* Исследование выполнено при поддержке Совета по грантам Президента РФ для поддержки ведущих научных школ Российской Федерации № НШ-1051.2003.4.

вать развитие хронического заболевания. Исход вирусной инфекции с одной стороны связан со способностью возбудителя блокировать апоптотический потенциал инфицированной клетки, а с другой — с интенсивностью активации процесса физиологической гибели инфицированной клетки как составной части защитного механизма организма. В связи с изложенным целью настоящего исследования явилась сравнительная оценка особенностей реализации апоптоза лимфоцитов периферической крови при хроническом гепатите С (ХГС).

Материалы и методы. Работа основана на результатах обследования 25 больных ХГС (17 мужчин и 8 женщин) в возрасте от 18 до 38 лет. Диагноз устанавливали на основании результатов клинико-лабораторного, инструментального и морфологического методов исследования. Этиологическую верификацию диагноза проводили путем обнаружения РНК HCV, серологических маркеров HCV (анти-HCV-антител к core, C-протеину, неструктурным белкам NS-3, NS-4, NS-5, анти-HCV-IgM). При морфологическом исследовании биоптатов печени гепатит со слабо выраженной активностью воспалительного процесса (3—8 баллов по Knodell) выявлен у 17 больных, с умеренной активностью (9—12 баллов по Knodell) — у 8 пациентов. У 14 пациентов заболевание длилось от 1 года до 5 лет, у 11 — более 5 лет. Группы сравнения составили 9 больных хроническим гепатитом В (ХГВ) и 8 пациентов с хронической микстинфекцией типа В + С (ХГВ + С), обследованных с помощью комплекса общепринятых лабораторно-инструментальных методов. В контрольную группу были включены 19 здоровых доноров с аналогичными характеристиками по полу и возрасту, не страдавших инфекционными заболеваниями и не предъявлявших на момент обследования жалоб соматического профиля. Материалом для исследования служила венозная кровь обследованных лиц, взятая утром до приема пищи и стабилизированная гепарином (10—15 ЕД/мл). Исследовали лимфоциты, выделенные из крови путем центрифугирования на слое фиколла—пака ("Pharmacia", Швеция) плотностью 1,077.

Содержание лимфоцитов, несущих маркер апоптотической предуготовленности CD95⁺-рецептор, оценивали иммуноцитохимическим методом [6] с использованием набора реагентов "Dako" (Дания). Для выявления специфических антигенов на поверхностной мембране клеток к суспензии выделенных лимфоцитов добавляли раствор моноклональных антител (МКАТ) мыши, специфичных к CD95-рецепторам, и инкубировали 60 мин. Затем препараты трижды отмывали фосфатным буфером (рН 7.2—7.4), после чего 30 мин инкубировали с биотинилированными связывающими антителами. После 3-кратного отмывания фосфатным буфером на препарат на 10 мин наносили стрептавидин, конъюгированный с щелочной фосфатазой, и повторяли отмывание. Затем образцы инкубировали с холодным хромоген-субстратом Fast Red в течение 10 мин. Хромоген смывали дистиллированной водой и препараты докрасивали гематоксилином ("Sigma", США). Учет результатов проводили в световом микроскопе с использованием масляной иммерсии, подсчитывая процент положительно окрашенных клеток на 200 лимфоцитов.

Регистрацию апоптоза лимфоцитов проводили методом ос-

мощью аннексина V, конъюгированного с ФИТЦ ("Caltag", США) [20]. Мононуклеары периферической крови ($2 \cdot 10^5$ клеток в лунке) культивировали в полной культуральной среде без митогена или с добавлением 10 мкг/мл фитогемагглютинаина (ФГА) ("Difco", ВД) в течение 18 ч при температуре 37°C в атмосфере с 5% CO₂. После отмывания клетки окрашивали стандартными МКАТ к CD4, меченными фикоэритрином — ФЭ ("Caltag") в течение 30 мин. Затем отмывали несвязавшиеся МКАТ и суспендировали клетки (10^6 в 1 мл) в аннексиновом буфере ("Caltag"), содержащем аннексин V-ФИТЦ. После 10 мин инкубации клетки подвергали двухцветной проточной цитофлуориметрии на цитометре "Epic XL" ("Beckman Coulter", Франция). Анализировали параметры зеленой (ФИТЦ — 530 нм) и оранжевой (ФЭ — 585 нм) флуоресценции в гейте лимфоцитарных клеток, выявляемых в режиме дот-плот.

Полученные данные обрабатывали методами вариационной статистики. Достоверность различий средних величин оценивали с помощью непараметрических критериев Манна—Уитни (для независимых выборок) и Вилкоксона (для зависимых выборок).

Результаты и обсуждение. Проведенные нами ранее исследования показали, что при ХГС изменения противовирусного иммунитета в наибольшей степени затрагивают систему неспецифической резистентности и Т-клеточное звено [5]. Функциональная неполноценность иммунокомпетентных клеток обусловлена повреждающим влиянием HCV на хромосомный аппарат лимфоцитов периферической крови [4] в результате интеграции генома вируса в клеточный ЛНК [11]. Очевидно, что клетки с цитогенетическими нарушениями должны вылетать из организма. В связи с этим нам представлялось возможным выяснить состояние апоптозореализующих механизмов в условиях хронической инфекции, вызванной HCV.

Изучая уровень апоптотической готовности лимфоцитарных клеток периферической крови, мы обнаружили достоверное увеличение содержания лимфоцитов, несущих CD95-рецептор, у пациентов с ХГС по сравнению со средними значениями аналогичного параметра у здоровых лиц (табл. 1). По нашему мнению, повышение количества Fas-положительных клеток у больных правильно рассматривать как адекватную реакцию организма, направленную на элиминацию инфектогена. Однако наличие на поверхности клетки Fas-рецептора вовсе не означает обязательной реализации клеткой заложенной программы гибели. Для этого необходимо связывание рецептора со специфическим лигандом, в качестве которого может выступать FasL [7].

При исследовании реализации программируемой клеточной смерти в аннексиновом тесте было

Таблица 1

Показатели апоптотической предуготовленности, спонтанного и ФГА-стимулированного апоптоза в общей популяции и в CD4⁺-фракции лимфоцитов периферической крови у больных ХГС

Показатель	Здоровые доноры	Больные ХГС	Больные ХГВ	Больные ХГВ + С
Количество CD95 ⁺ -лимфоцитов, %	10,83 ± 1,13	16,40 ± 1,72 ^б	10,84 ± 1,14	13,67 ± 2,79
Все лимфоциты:				
спонтанный апоптоз, %	10,65 ± 0,93	8,95 ± 1,14	7,96 ± 1,58	6,01 ± 0,85
ФГА-стимулированный апоптоз, %	9,14 ± 1,30	5,54 ± 0,87 ^{а,б}	16,75 ± 2,99 ^{а,б,г}	3,73 ± 1,16 ^{а,б,г}
CD4 ⁺ -лимфоциты:				
спонтанный апоптоз, %	11,19 ± 1,38	4,29 ± 0,79 ^б	5,21 ± 0,09 ^б	5,77 ± 0,35 ^{б,г}
ФГА-стимулированный апоптоз, %	11,67 ± 3,13	2,43 ± 0,47 ^{а,б}	17,94 ± 5,33 ^{а,б}	2,16 ± 0,91 ^{а,б,г}

Примечание. а — $p < 0,05$ по сравнению со спонтанным апоптозом; б — $p < 0,05$ по сравнению со здоровыми донорами; в — $p < 0,05$ по сравнению с больными ХГС; г — $p < 0,05$ по сравнению с больными ХГВ.

Таблица 2

Показатели апоптотической подготовленности, спонтанного и ФГА-стимулированного апоптоза в общей популяции и в CD4⁺-фракции лимфоцитов периферической крови у больных ХГС с разной степенью активности инфекционного процесса в печени

Показатель	Здоровые доноры	Больные ХГС	
		со слабой активностью воспалительного процесса	с умеренной активностью воспалительного процесса
Количество CD95 ⁺ -лимфоцитов, %	10,83 ± 1,13	17,20 ± 1,85 ^б	14,50 ± 1,94 ^б
Все лимфоциты:			
спонтанный апоптоз, %	10,65 ± 0,93	8,76 ± 1,03	9,97 ± 2,02
ФГА-стимулированный апоптоз, %	9,14 ± 1,30	4,73 ± 0,68 ^а	6,68 ± 1,21 ^а
CD4 ⁺ -лимфоциты:			
спонтанный апоптоз, %	11,19 ± 1,38	5,72 ± 1,17 ^б	2,27 ± 0,76 ^{б, в}
ФГА-стимулированный апоптоз, %	11,67 ± 3,13	3,07 ± 0,78 ^б	2,19 ± 0,22 ^б

Примечание. а — $p < 0,05$ по сравнению со спонтанным апоптозом; б — $p < 0,05$ по сравнению со здоровыми донорами; в — $p < 0,05$ по сравнению с больными ХГС со слабой активностью.

установлено, что по уровню спонтанного апоптоза лимфоцитов пациенты с ХГС не отличались от здоровых доноров (см. табл. 1). После действия Т-клеточного митогена ФГА в 18-часовой культуре стимулированных лимфоцитов при ХГС зарегистрировано достоверное снижение содержания апоптотических клеток (см. табл. 1). Снижение количества лимфоцитов, вступивших в активационный апоптоз, у больных ХГС, по-видимому, является результатом поломки естественной реализации программной клеточной гибели. В итоге большинство клеток пролиферируют, обеспечивая тем самым персистенцию вируса в организме.

Таким образом, несмотря на высокий уровень экспрессии Fas-рецептора лимфоцитами при ХГС, отмечается их блокада. Изменение чувствительности клетки к Fas-индуцированному апоптозу может быть обусловлено нарушением функции данного рецептора, дисбалансом между уровнями экспрессии мембранной и растворимой форм Fas-рецептора и FasL, а также лигандными изменениями, возникающими после активации данного рецептора [7].

При формировании хронической инфекции вирусы для обеспечения собственного выживания используют пути, позволяющие им избежать действие защитных реакций организма [3, 16]. В интересах инфектогена поглотить апоптоз и тем самым сохранить клетке жизнеспособность. Антиапопто-

тическая стратегия HCV сводится, в частности, к подавлению функции проапоптогенного белка p53, инактивации каспаз, а также к усилению экспрессии ингибитора апоптоза Bcl-X_L [14, 17].

В процессе иммунного ответа осуществляется коррекция соотношения функциональных субклассов Т-клеток, при этом в качестве инструмента используется неравномерность вовлечения CD4⁺- и CD8⁺-клеток в пролиферацию и апоптоз [2]. В настоящее время известно, что при формировании противовирусного иммунитета CD4⁺-лимфоциты под влиянием антигенпрезентирующих клеток пролиферируют с образованием Th1-клеток. В свою очередь эти клетки, экспрессируя цитокины, усиливают и стимулируют функцию цитотоксических лимфоцитов, а также принимают прямое участие в уничтожении возбудителей [8]. Получены данные, свидетельствующие о том, что хронизация инфекционного процесса связана с нарушением равновесия в активации CD4⁺-лимфоцитов по пути доминирования Th2-ответа. Th2-лимфоциты, выделяя провоспалительные цитокины, блокируют пролиферацию Th1-клеток, подавляя таким образом специфические цитотоксические реакции [3, 18]. В связи с этим особый интерес для нас представляло исследование изменений апоптоза CD4⁺-лимфоцитов периферической крови при вирусной инфекции.

Таблица 3

Показатели апоптотической подготовленности, спонтанного и ФГА-стимулированного апоптоза в общей популяции и в CD4⁺-фракции лимфоцитов периферической крови у больных ХГС с разной длительностью заболевания

Таблица 3

Показатели апоптотической подготовленности, спонтанного и ФГА-стимулированного апоптоза в общей популяции и в CD4⁺-фракции лимфоцитов периферической крови у больных ХГС с разной длительностью заболевания

Показатель	Здоровые доноры	Больные ХГС	
		длительность заболевания менее 5 лет	длительность заболевания более 5 лет
Количество CD95 ⁺ -лимфоцитов, %	10,83 ± 1,13	11,6 ± 7,83	9,72 ± 1,01
Все лимфоциты: спонтанный апоптоз, %	10,65 ± 0,93	9,10 ± 1,42	8,91 ± 1,01
ФГА-стимулированный апоптоз, %	9,14 ± 1,30	4,72 ± 1,24 ^а	6,61 ± 1,48
CD4 ⁺ -лимфоциты: спонтанный апоптоз, %	11,19 ± 1,38	5,90 ± 1,61 ^б	3,29 ± 0,67 ^б
ФГА-стимулированный апоптоз, %	11,67 ± 3,13	2,69 ± 0,62 ^б	2,41 ± 0,87 ^б

Примечание. а — $p < 0,05$ по сравнению со спонтанным апоптозом; б — $p < 0,05$ по сравнению со здоровыми донорами; достоверных различий исследуемых параметров между группами больных ХГС с различной достоверностью заболевания не выявлено.

Оценка уровней спонтанного и активационного апоптоза Т-хелперов показала, что среднее количество CD4⁺-лимфоцитов, подвергшихся апоптозу, у больных ХГС достоверно ниже, чем у здоровых доноров (см. табл. 1). При сравнительном анализе уровня ФГА-стимулированного апоптоза среди лимфоцитов, экспрессирующих молекулу CD4, были установлены такие же тенденции, как и в общей популяции лимфоцитарных клеток крови: в присутствии митогена апоптоз CD4⁺-лимфоцитов при ХГС ингибировался (см. табл. 1). Выявленные изменения могут быть результатом вирусиндуцированного срыва компенсаторных механизмов регуляции в системе иммунитета и преобладания антиапоптотического потенциала вируса над защитными клеточными реакциями. Как известно, пептиды HCV являются функциональными антагонистами Т-рецепторов. Вызываемая "Т-клеточная анергия" в значительной степени блокирует хелперную активность, что способствует хронизации инфекционного процесса [15].

Изучена возможная связь между уровнем апоптотической гибели лимфоцитов крови и некоторыми клиническими особенностями течения хронической инфекции. Как показывают результаты, представленные в табл. 2, ХГС умеренной степени активности сопровождается более глубоким подавлением апоптоза CD4⁺-клеток, чем ХГС слабовыраженной степени активности. Установлено, что у больных ХГС длительность инфекционного процесса не вносит существенных изменений в процесс апоптотического ответа лимфоцитов крови (табл. 3).

Для оценки возможного участия возбудителя в генезе выявленных изменений были исследованы показатели спонтанного и активационного апоптоза лимфоцитов у больных ХГВ и ХГВ + С. Обнаружено, что ХГВ сопровождается повышенным процентом клеток, вступивших в апоптоз при культивировании с митогеном, как в общей популяции лимфоцитов, так и среди CD4⁺-клеток по сравнению с соответствующими параметрами в норме и при ХГС (см. табл. 1). Апоптотический ответ лимфоцитов крови на стимуляцию ФГА у пациентов с микстинфекцией, вызванной возбудителями гепатитов В и С, имеет характер, аналогичный изменениям данного показателя у больных ХГС, что свидетельствует о подавляющем влиянии HCV на иммунологическую реактивность по сравнению с вирусом гепатита В.

Возбудитель гепатита В, по-видимому, использует другие механизмы "иммунного ускользания". Показано, что HBx-белок HBV индуцирует апоптоз чувствительных клеток [10]. Кроме этого, прямым агентом, инициирующим Fas-опосредованную гибель, является HBs-антиген [19]. По данным J. Ehrmann и соавт. [12], у HBs-антигенположительных лиц повышена экспрессия проапоптотического белка Вах в гепатоцитах и лимфоцитах. Однозначная интерпретация полученных результатов представляется затруднительной. С одной стороны, усиление апоптоза Т-лимфоцитов крови при ХГВ можно рассматривать как защитную реакцию организма, направленную на противостояние дальнейшей экспансии возбудителя. С другой стороны, чрезмерная гибель клеток, осуществляющих реали-

зацию противовирусного иммунитета, обуславливает дефект Т-звена и неадекватность иммунного ответа, что позволяет вирусу длительно сохраняться в организме с формированием хронического инфекционного процесса.

Таким образом, для ХГС характерно ингибирование апоптоза как в общей популяции лимфоцитов, так и среди CD4⁺-клеток. Выявленные тенденции наиболее ярко проявлялись при оценке "активационного апоптоза", которому подвергаются клетки при их стимуляции митогенами, в частности ФГА. Стратегия выживания HCV, вероятно, направлена на активное блокирование Fas-опосредованной гибели инфицированных клеток как защитной реакции организма на инфектоген, что способствует поддержанию хронической персистенции возбудителя. Очевидно, что вирусы гепатитов В и С используют разные механизмы дисрегуляции апоптоза клеток иммунной системы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белушкина Н. Н., Северин С. Е. Молекулярные основы патологии апоптоза // Арх. пат. — 2001. — № 1. — С. 51—60.
2. Григорьева Т. Ю., Никонова М. Ф., Ярилин А. А. Различная чувствительность к индукции апоптоза Т-лимфоцитов субклассов CD4⁺ и CD8⁺ // Иммунология. — 2002. — № 4. — С. 200-205.
3. Ивашкин В. Т., Маммаев С. Н., Быверов А. О. и др. Взаимное действие вирусов гепатита В и С с клетками иммунной системы макроорганизма // Клини. лаб. диагн. — 2001. — № 7. — С. 45-48.
4. Рязаницева Н. В., Жукова О. Б., Новицкий В. В. и др. Роль иммунофенотипических и цитогенетических изменений лимфоцитов крови в механизмах хронизации вирусной инфекции // Эпидемиол. и вакцинопрофилактик. — 2003. — Т. 13, № 6. — С. 23-27.
5. Рязаницева Н. В., Жукова О. Б., Белобородова Э. И. и др. Изменения цитогенетического статуса лимфоцитов периферической крови при хронических HBV- и HCV-инфекциях // Рос. журн. гастроэнтерол. гепатол., колопроктол. — 2004. — Т. 14, № 1. — С. 37-40.
6. Толоян А. А., Балдueva И. А., Бубнова Л. К. и др. Стандартизация методов иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга человека // Клини. лаб. диагн. — 2002. — № 1. — С. 44-50.
7. Фильченков А. А., Степанов Ю. М., Луцкий В. М. и др. Участие системы Fas/Fas-лиганд в регуляции гомеостаза и функционировании клеток иммунной системы // Аллергол. и иммунол. — 2002. — Т. 3, № 1. — С. 24—35.
8. Хаитов Р. М., Пинегин Б. В. Современные представления о защите организма от инфекции // Иммунология. — 2000. — № 1. — С. 61-64.
9. Ярилин А. А., Никонова М. Ф., Ярилина А. А. и др. Апоптоз, роль в патологии, значимость его оценки при клинико-иммунологическом обследовании больных // Мед. иммунол. — 2000. — Т. 2. — С. 7-16.
10. Chang Z. S., Zeng L. B., Chang Z. S. et al. Aggregate formation of hepatitis B virus X protein affects cell cycle and apoptosis // World J. Gastroenterol. — 2003. — Vol. 9, N 7. — P. 1521-1524.
11. Ehrmann J. Jr., Galuszkova D., Ehrmann J. et al. Apoptosis-related proteins Bcl-2, Bax, Fas, Fas-L and PCNA in liver biopsies of patients with chronic hepatitis B virus infection // Pathol. Oncol. Res. — 2000. — Vol. 6, N 2. — P. 130-135.
12. Dillon A. P., Dusheiko G. M. Pathology of hepatitis C virus infection // Histopathology. — 1995. — Vol. 26, N 4. — P. 297-309.
13. Hav S., Kannourakis G. A time to kill: viral manipulation of the cell death program // J. Gen. Virol. — 2002. — Vol. 83. — P. 1547-1564.
14. Kountouras J., Zavos C., Chatzopoulos D. Apoptosis in hepatitis C // J. Viral Hepat. — 2003. — Vol. 10, N 5. — P. 335-342.
15. Nelson D. R., Marousis C. G., Davis G. L. et al. The role of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in chronic hepatitis C // J. Immunol. — 1997. — Vol. 158, N 3. — P. 1473-1481.
16. Oldstone M. B. Viral persistence // Cell. — 1989. — Vol. 56, N 4. — P. 517-520.

17. *Otsuka M., Kato N., Taniguchi H.* et al. Hepatitis C virus core protein inhibits apoptosis via enhanced Bcl-xL expression // *Virology*. - 2002. - Vol. 296, N 1. - P. 84-93.
18. *Pope G. R., Gerlach T. J., Diepolder H. M.* et al. Role of the specific T-cell response for clearance and control of hepatitis C virus // *J. Viral Hepat.* - 1999. - Vol. 6, N 1. - P. 36-40.

19. *Tanaka M., Suda T., Yatomi T.* Lethal effect of recombinant human Fas ligand in mice pretreated with fröpiobacterium asnes // *J. Immunol.* - 1997. - Vol. 158, N 5. - P. 2303-2309.
20. *Van Engeland M., Nieland L. J. W., Ramaekers F. C. S.* et al. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure // *Cytometry*. — 1998. - Vol. 31. - P. 1-9.

Поступила 03.11.04

