

*На правах рукописи*

**Жукова Оксана Борисовна**

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДИЗРЕГУЛЯЦИИ  
АПОПТОЗА ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ПЕРСИСТЕНТНЫХ  
ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЯХ**

14.00.16 – патологическая физиология  
03.00.25 – гистология, цитология, клеточная биология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
доктора медицинских наук

Томск - 2006

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»

**Научные консультанты:**

доктор медицинских наук

**Рязанцева Наталья Владимировна**

доктор медицинских наук,  
профессор, академик РАМН,  
Заслуженный деятель науки РФ

**Новицкий Вячеслав Викторович**

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук, профессор

**Федорова Татьяна Сергеевна**

доктор медицинских наук, профессор,  
академик РАМН

**Якобсон Григорий Семенович**

доктор медицинских наук, профессор,  
член-корреспондент РАМН

**Непомнящих Лев Моисеевич**

**Ведущая организация:**

Государственное учебно-научное учреждение факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, г. Москва

Защита состоится « \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2006 г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при Сибирском государственном медицинском университете (634050, г. Томск, ул. Московский тракт, 2)

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке Сибирского государственного медицинского университета (634050, Томск, пр. Ленина, 107)

Автореферат разослан « \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2006 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

Суша-



нова Г.А.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Вирусные инфекции являются важной медико-биологической проблемой. Их значимость во многом обусловлена повсеместной распространенностью и возрастающей частотой хронизации инфекционного процесса [Погодина В.В. и соавт., 1986; Tremoloda F. et al., 1991; Okoth F.A., 1996; Sharara A.L. et al., 1996; Серов В.В., Мухин Н.А., 2000; Антонов П.В., Цинзерлинг В.А., 2001]. Несмотря на постоянно расширяющийся объем знаний о причинах развития хронических инфекций, нерешенным остается вопрос о механизмах, приводящих при одном и том же возбудителе к разным исходам болезни – выздоровлению, бессимптомному носительству, трансформации в прогрессивную хроническую форму с соответствующими осложнениями (в случае вирусного гепатита – цирроз и злокачественные новообразования печени; при клещевом энцефалите – параличи и парезы). В связи с этим внимание исследователей все чаще обращается на состояние иммунной системы организма, являющейся одной из основных (наряду с нервной и эндокринной) систем, участвующих в формировании стратегии функционирования организма в новых условиях [Нургалиев Д.Ж., Омарова К.О., 2002].

К числу фундаментальных механизмов регулирования функционирования системы иммунитета относится апоптоз. Под апоптозом понимают физиологическую форму гибели клеток, основная функция которой заключается в уравнивании эффекта клеточной пролиферации, элиминации поврежденных, функционально неполноценных и инфицированных клеток [Ярилин А.А. и соавт., 2000; Барышников А.Ю., Шишкин А.В., 2002]. Апоптоз является одним из ключевых процессов поддержания клеточного гомеостаза, который контролируется и регулируется многочисленными факторами. Прежде всего это внеклеточные сигнальные молекулы, запускающие и реализующие запрограммированную гибель клеток (молекулы семейства фактора некроза опухоли (TNF), некоторые цитокины), рецепторы к этим молекулам (Fas-R, TNF-RI, TCR-CD3), внутриклеточные мессенджеры (NO, Ca<sup>2+</sup>, цАМФ, цГМФ), протеинкиназы, протеинтирозинкиназы, сериновые протеазы (семейства ICE и Mch), стимуляторы апоптоза (Bax, Bcl-X<sub>s</sub>, Bad, Bak), ингибиторы апоптоза (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> и др.), эндонуклеазы и другие [Проскуряков С.Я. и соавт., 2000; Montag D. et al., 2000; Schachner M., 2000; Лушников Е.Ф. и соавт., 2001; Скулачев В.П., 2001; Leist M., Jaattela M., 2001; Fensome A.C., Rodrigues-Lima F., 2003].

В последнее время стало ясно, что с позиции апоптоза можно объяснить формирование хронического инфекционного процесса, в том числе и вирусной природы, поскольку дисбаланс между пролиферативной активностью клеток и запрограммированной клеточной смертью ведет к патологическим изменениям органов и тканей. Однако эта проблема лишь недавно привлекла к себе должное внимание исследователей. Было установлено, что при вирусных инфекциях

сосуществуют факторы, индуцирующие и ингибирующие программированную клеточную смерть [Zychlinsky A., 1993; Владимирская Е.Б. и соавт., 1997; Мажанский А.Н. и соавт., 1997; Буеверов А.О. и соавт., 2000; Roy D.J et al., 2000; Belanher C. et al., 2001; Bellows P.S. et al., 2002; Hay S., Kannourakis G., 2002]. Предполагается, что главным способом киллинга вирусинфицированных клеток являются рецепторный и перфорин-гранзимовый механизмы индукции апоптоза [Tanaka M. et al., 1998]. Кроме того, инфекционный процесс сопровождается усилением продукции активных кислородных радикалов, запускающих гибель клеток по митохондриальному пути [Ehrmann I.Ir. et al., 2000]. Следствием вирусиндуцированного повреждения ДНК являются р53-опосредованные реакции развития апоптоза [Zhang Y. et al., 2002].

В целом исследования последних лет показали, что, несмотря на достигнутые успехи, до настоящего времени не сформированы четкие представления о молекулярных механизмах дизрегуляции апоптотической гибели иммунокомпетентных клеток крови при инфекционной патологии. В связи с этим возникает необходимость проведения комплексной оценки состояния путей регуляции апоптоза лимфоцитов периферической крови в условиях длительной персистенции разных видов вирусов с учетом клинических особенностей инфекционного процесса, что, вероятно, позволит получить новые данные фундаментального характера о ведущих механизмах и ключевых молекулярных мишенях нарушения процесса программированной гибели клеток при хронических вирусных инфекциях.

**Цель исследования:** выявить роль и молекулярные пути модуляции апоптоза лимфоцитов периферической крови в патогенезе персистентных вирусных инфекций.

**Задачи исследования:**

1. Выявить общие закономерности и особенности реализации программированной гибели лимфоцитов крови у пациентов с персистентными инфекциями, вызванными вирусами клещевого энцефалита, гепатита В и С.
2. Определить чувствительность лимфоцитов крови у пациентов с персистентными вирусными инфекциями к апоптогенным стимулам различных механизмов действия *in vitro*.
3. Дать комплексную характеристику состояния Fas- и TNF-опосредованного рецепторного, митохондриального и р53-зависимого путей регуляции апоптоза лимфоцитов крови при персистентных инфекциях, вызванных вирусами клещевого энцефалита, гепатита В и С.
4. Установить ключевые молекулярные механизмы дизрегуляции программированной гибели лимфоцитов крови у пациентов с хроническим вирусным гепатитом В, С и В+С, хронической антигенемией вируса клещевого энцефалита.

**Научная новизна.** Впервые с привлечением широкого комплекса современных культуральных, иммунологических и молекулярно-биологических методов исследования освещены молекулярные механизмы реализации программированной гибели лимфоцитов периферической крови при персистентных вирусных инфекциях. Установлено, что нарушение реализации программированной гибели лимфоцитов является одним из звеньев иммунопатогенеза вирусных инфекций, вызванных возбудителями клещевого энцефалита, гепатита В и С.

Показано, что дисбаланс клеточного звена иммунитета при персистентных вирусных инфекциях сопряжен с ингибированием апоптоза лимфоцитов у пациентов с хроническим вирусным гепатитом С и микст-инфекцией В+С, со стимулированием апоптотической гибели – у пациентов с длительной антигенемией вируса клещевого энцефалита. Получены фактические данные, указывающие на дискоординированность вступления в процесс апоптоза CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов, что определяет характер иммунологических расстройств. Выявлена повышенная чувствительность лимфоцитов, полученных от пациентов с персистентными вирусными инфекциями, к апоптоз-модулирующим факторам с различными механизмами действия (глюкокортикостероидные гормоны, ингибиторы ДНК-топоизомеразы, дефицит сывороточных ростовых факторов) *in vitro* по сравнению с нормой, что свидетельствует об истощении резервного потенциала клеток.

При персистенции вирусов клещевого энцефалита и гепатита В, С увеличивается содержание Fas-положительных лимфоцитов периферической крови. Готовность лимфоцитарных клеток к индукции процесса апоптоза наиболее выражена при бессимптомном носительстве антигена вируса клещевого энцефалита и у пациентов с хроническим гепатитом С слабовыраженной степени активности. Продемонстрировано нарушение реализации TNF $\alpha$ -опосредованного пути программированной гибели лимфоцитов крови при хроническом вирусном гепатите В, С и В+С вследствие изменения функционирования рецепторного аппарата клетки (снижения уровня презентации мембран-ассоциированного TNF-RI на фоне увеличения продукции его растворимой формы). Впервые выявлено, что для длительной антигенемии вируса клещевого энцефалита, хронического гепатита С и В+С характерно стимулирование митохондриального пути апоптоза лимфоцитов крови. Установлено, что персистентное течение вирусных инфекций сопровождается явлениями цитогенетической нестабильности лимфоцитов крови, проявляющейся структурными хромосомными абберациями и снижением активности системы эксцизионной репарации ДНК клеток, что свидетельствует о нарушении р53-зависимого механизма программированной клеточной гибели.

**Теоретическая и практическая значимость.** Полученные данные фундаментального характера раскрывают новые патофизиологические аспекты

персистентных вирусных инфекций. Показана значимая роль дисрегуляции апоптоза иммунокомпетентных клеток крови в механизмах формирования длительной персистенции возбудителей клещевого энцефалита, гепатита В и С. Выявлены ключевые молекулярные мишени нарушения процесса программированной гибели клетки при хронических вирусных инфекциях. Основные положения исследования могут служить основой для разработки молекулярной технологии воздействия на сигналпередающие пути реализации апоптоза иммунокомпетентных клеток с целью проведения персонализированной патогенетически обоснованной коррекции иммунных нарушений и своевременной профилактики угрожающих жизни пациентов осложнений.

***Положения, выносимые на защиту:***

1. Персистентные вирусные инфекции, вызванные возбудителями клещевого энцефалита, гепатита В и С, сопровождаются разбалансировкой клеточного звена иммунитета, сопряженной с ингибированием апоптоза лимфоцитов при хроническом вирусном гепатите С и В+С, со стимулированием программированной гибели клеток – при длительной антигенемии вируса клещевого энцефалита.
2. При хроническом вирусном гепатите В, С и В+С, длительной антигенемии вируса клещевого энцефалита дискоординировано вовлечение в апоптоз регуляторных (CD4+) и эффекторных (CD8+) лимфоцитов.
3. Механизмы нарушения программированной гибели лимфоцитов у пациентов с персистентными вирусными инфекциями связаны с изменением их чувствительности к проапоптогенным факторам.
4. При хронических инфекциях, вызванных вирусами клещевого энцефалита, гепатита В и С, нарушение реализации апоптоза лимфоцитарных клеток крови обусловлено дисрегуляторными изменениями рецепторного, митохондриального и р53-опосредованного путей проведения апоптогенного сигнала.

***Апробация и реализация работы.*** Результаты проведенных исследований докладывались и обсуждались на 5-м Конгрессе «Современные проблемы аллергологии, иммунологии и иммунофармакологии» (Москва, 2002), Международном симпозиуме «Успехи современного естествознания» (Сочи, 2002), VI Российском съезде «Врачей инфекционистов» (Санкт-Петербург, 2003), Второй международной конференции «Патофизиология и современная медицина» (Москва, 2004), Международной конференции «Молекулярная медицина и биобезопасность» (Москва, 2004, 2005 гг.), Третьем российском конгрессе по патофизиологии с международным участием «Дисрегуляторная патология органов и систем» (Москва, 2004), Всероссийской конференции «Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии» (Санкт-Петербург, 2004), Международной конференции «Развитие международного сотрудничества в области изучения инфекционных заболеваний» (Новосибирск, 2004), 6-ой Всероссий-

ской научно-практической конференции «Вирусные гепатиты - проблемы эпидемиологии, диагностики, лечения и профилактики» (Москва, 2005), V Сибирском физиологическом съезде (Томск, 2005), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием к 100-летию со дня рождения А.Г. Панова «Современное состояние проблемы нейроинфекций» (Санкт-Петербург, 2005), XII Российском Национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2005), Международном конгрессе «Иммунитет и болезни: от теории к терапии» (Москва, 2005), Всероссийской научно-практической конференции «Современная ситуация и перспективы борьбы с клещевыми инфекциями в XXI веке» (Томск, 2006), 6-ой Восточно-сибирской гастроэнтерологической конференции с международным участием «Клинико-эпидемиологические и этно-экологические проблемы заболеваний органов пищеварения» (Красноярск, 2006), Съезде неврологов Сибирского федерального округа (Ярославль, 2006), Российском медицинском форуме с международным участием «Фундаментальная наука и практика» (Москва, 2006).

Основные положения и выводы диссертационной работы используются в лекциях по патологической физиологии (разделы «Патофизиология инфекционного процесса», «Патофизиология иммунной системы», «Патофизиология клетки») и микробиологии (разделы «Рабдо- и арбовирусы», «Возбудители гепатитов») для студентов 2-3 курсов лечебного и педиатрического факультетов, а также в лекционном курсе по инфекционным болезням для студентов 5 курса лечебного и педиатрического факультетов Сибирского государственного медицинского университета.

В работе приводятся результаты исследований, поддержанных Советом при Президенте РФ для поддержки ведущих научных школ РФ по проблемам «Молекулярные механизмы нарушения структуры, метаболизма и функции клеток крови при патологии» (НШ-1051.2003.4) и «Молекулярные основы нарушения гомеостаза клеток крови при актуальных заболеваниях инфекционной и неинфекционной природы» (НШ-4153.2006.7), а также результаты научно-исследовательских работ «Молекулярные механизмы предрасположенности и резистентности организма человека к персистентным бактериальным и вирусным инфекциям» РИ-112/001/158 (Государственный контракт от 05.09.2005 г. № 02.445.11.7110), «Идентификация молекулярных мишеней управления апоптозом клеток при вирусных инфекциях» РИ-19.0/001/011 (Государственный контракт от 26.11.2005 г. № 02.442.11.7004) и «Молекулярные и клеточные основы управления реактивностью системы крови при актуальных заболеваниях инфекционной природы» 2006-РИ-112.0/001/384 (Государственный контракт от 09.06.2006 г. № 02.445.11.7419) в рамках ФЦНТП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники на 2002-2006 годы».

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 60 работ, 18 из которых – в центральных рецензируемых журналах, одна монография в соавторстве.

**Объем и структура работы.** Диссертация изложена на 273 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, выводов и списка литературы, включающего 462 источника, из которых 176 отечественных и 286 иностранных. Работа иллюстрирована 51 таблицей и 28 рисунками.

## **ХАРАКТЕРИСТИКА КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

В настоящей работе представлены результаты комплексного обследования 244 человек (161 мужчина и 83 женщины в возрасте от 18 до 50 лет) с длительной антигенемией вируса клещевого энцефалита (ТВЕV), хроническими вирусными гепатитами В, С и В+С. Пациенты находились на стационарном лечении и диспансерном учете в инфекционном отделении госпитальных клиник ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава, в терапевтическом отделении МЛПУ «Медико-санитарная часть «Строитель» г. Томска», гастроэнтерологическом отделении Томской областной клинической больницы и инфекционном отделении МЛПУ «Городская больница №3 г. Томска». Набор клинического материала осуществлялся при непосредственном участии зав. кафедрой инфекционных болезней ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава, д.м.н., профессора А.В. Лепехина, зав. кафедрой терапии ФПК и ППС ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава, д.м.н., профессора Э.И. Белобородовой, профессора кафедры неврологии и нейрохирургии ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава д.м.н. Н.Г. Жуковой и доцента кафедры госпитальной терапии ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава к.м.н. Е.В. Белобородовой. Обследование проводилось до назначения специфической противовирусной и иммунокорректирующей терапии. Контрольной группой служили 80 здоровых доноров с аналогичными характеристиками по полу и возрасту. Клинически и анамнестически у всех обследованных лиц были исключены инфекционные заболевания другой этиологии, обострение хронических воспалительных процессов, аутоиммунные, наследственные и психические болезни, а также злоупотребление алкоголем и прием гепатотоксических лекарств.

В зависимости от этиологического фактора и ведущей органной патологии наблюдавшиеся пациенты были разделены на две группы. Первую группу составили 72 человека с антигенемией ТВЕV, ко второй – были отнесены 172 пациента с хроническим вирусным гепатитом.

Диагноз клещевого энцефалита (рубрика А84.0 МКБ-10) у обследованных пациентов в острый период заболевания верифицировался на основании данных эпидемиологического анамнеза, оценки неврологического статуса, определения уровня специфических антител к антигену вируса клещевого энцефалита



методами непрямой реакции гемагглютинации и иммуноферментного анализа, обнаружения вирусной РНК методом полимеразно-цепной реакции (ПЦР), а также результатов инструментального исследования.

В зависимости от особенностей клинических и лабораторных проявлений клещевой нейроинфекции была выделена группа из 53 пациентов с длительным (более 6 месяцев после острого периода инфекционного процесса) бессимптомным носительством антигена ТВЕV. У лиц, отнесенных к данной группе, при наличии в крови вирусной РНК клиническая картина начального периода заболевания практически редуцировалась.

Вторую группу составили 19 больных с остаточными проявлениями нейроинфекции в виде цереброгенной астении и антигенемии ТВЕV (более 6 мес после острого периода заболевания). Основными клиническими проявлениями патологии были стойкий астено-вегетативный синдром, упорные головные боли, бессонница, снижение инициативы и памяти. В неврологическом статусе выявлялись рассеянные органические микрознаки: слабость конвергенции, легкий центральный парез мимической мускулатуры, анизорефлексия глубоких брюшных рефлексов. Из вегетативных расстройств обращали на себя внимание бледность кожных покровов, гипергидроз дистальных отделов конечностей, повышенная общая потливость. У лиц, отнесенных к данной клинической категории, в течение 6-8 мес после острого периода на фоне резидуальной неврологической симптоматики в крови обнаруживались РНК и антиген ТВЕV, а также повышенный уровень специфического IgG.

В программу обследования были включены 172 пациента, страдающих вирусным гепатитом В, С и В+С (по МКБ-10 рубрики В18.0 – хронический вирусный гепатит В с  $\delta$ -антигеном, В18.1 – хронический вирусный гепатит В без  $\delta$ -антигена, В18.2 – хронический вирусный гепатит С, В18.8 – другой хронический вирусный гепатит). Все пациенты представляли собой группу риска по инфицированию возбудителями гепатита В (HBV) и С (HCV) (в анамнезе были оперативные вмешательства с переливанием крови, лечебные инъекции многократными шприцами, лечение и удаление зубов, эпизоды наркомании, сексуальные и тесные бытовые контакты с больными вирусными гепатитами, работа с препаратами крови и больными у медицинских работников). Давность заболевания составляла от 1 года до 16 лет (в среднем  $5 \pm 2$  года).

Диагноз хронического вирусного гепатита основывался на наличии клинико-инструментальных симптомов (гепато-, спленомегалии) и клинико-лабораторных синдромов (холестаза, цитолиза, мезенхимально-воспалительного синдрома). Этиологическая верификация диагноза проводилась путем выявления в крови ДНК HBV, РНК HCV (метод ПЦР), серологических маркеров HBV (Hbe-антиген, HBs-антиген, анти-Hbcor IgM, анти-Hbcor суммарные) и HCV (анти-HCV Ig к cor, С-протеину, неструктурным белкам NS-3, NS-4, NS-5, анти-HCV IgM). С целью морфологического подтверждения диа-

гноза и определения степени активности воспалительного процесса с использованием гистологического индекса активности по А. Knodell [1981] и стадии фиброза по U. Desmet [1995] всем пациентам проводилась пункционная биопсия печени по Mengini. На основе данных морфологического анализа полученного биопсийного материала выделяли минимальную (1–3 балла), слабовыраженную (4–8 баллов), умеренную (9–13 баллов) и выраженную степени активности воспалительного процесса (более 13 баллов).

В соответствии с классификацией, принятой Всемирным конгрессом гастроэнтерологов в Лос-Анжелесе [1994], были выделены следующие клинические группы: 1) больные хроническим гепатитом В умеренной степени активности – 30 человек; 2) больные хроническим гепатитом В слабовыраженной степени активности – 19 человек; 3) больные хроническим гепатитом С умеренной степени активности – 31 человек; 4) больные хроническим гепатитом С слабовыраженной степени активности – 42 человека; 5) больные хроническим микст-гепатитом В+С слабовыраженной степени активности – 22 человека; 6) больные хроническим микст-гепатитом В+С умеренной степени активности – 28 человек.

Анализ клинической картины у больных хроническими вирусными гепатитами умеренной степени активности показал, что наиболее часто выявлялся астено-вегетативный синдром (87,8%). Диспепсический синдром (непереносимость жирной пищи, тошнота, горечь во рту, изжога, метеоризм) встречался у 65,9% пациентов. Синдром холестаза (желтушное окрашивание кожи и склер, зуд, билирубинемия) чаще обнаруживался у больных хроническим гепатитом С (45,2%), чем у пациентов с хроническими гепатитами В (30,0%) и В+С (28,6%). В большинстве случаев гепато- и спленомегалия, выявленные физикально, подтверждались результатами ультразвукового исследования. При анализе биохимических показателей крови ведущим был синдром цитолиза (64,3%).

Пациенты, объединенные в группу с хроническим гепатитом слабовыраженной степени активности, характеризовались отсутствием клинической симптоматики поражения печени, нормальными значениями биохимических показателей. Из серологических маркеров HBV- и HCV-инфекции у них выявлялись HBs-антиген и анти-HCV IgG соответственно. Эпизодически они получали курсы общеукрепляющей терапии. Трудовая деятельность не страдала.

У пациентов с длительной вирусной персистенцией и у здоровых доноров проводили комплексное исследование особенностей реализации апоптоза лимфоцитов периферической крови, включавшее оценку иммунофенотипического и цитогенетического статуса лимфоцитов, сравнительный анализ вовлеченности в спонтанный и активационный апоптоз разных субпопуляций лимфоцитарных клеток, исследование чувствительности лимфоцитов к стимуляторам программированной клеточной гибели с различными механизмами действия в условиях *in vitro*, определение состояния рецепторного, митохондриального и

p53-опосредованного путей проведения апоптогенного сигнала. Распределение обследованных пациентов по группам в соответствии с использованными методами исследования представлено в таблице 1.

Материалом исследования являлась венозная кровь обследованных лиц, взятая утром до приема пищи и стабилизированная гепарином (25 Ед/мл).

Определение количества лимфоцитов периферической крови проводили стандартными гематологическими методами [Козинец Г.И., Макаров В.А., 1997]. Лимфоциты выделяли по методу Дж. Натвиг и соавт. [1980].

Иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови по CD-маркерам (CD3, CD4, CD8, CD22, CD56) проводили иммуноцитохимическим методом [Тотолян А.Н. и соавт., 2002]. Результаты выражали в процентных и абсолютных значениях.

Выделенные в стерильных условиях на градиенте плотности мононуклеары периферической крови культивировали в 96-луночных круглодонных планшетах в объеме 200 мкл. В лунки вносили суспензию клеток ( $2 \cdot 10^5$  на лунку), а также полную культуральную среду без митогена, состоящую из 90% RPMI-1640 («Вектор-Бест», Новосибирск), 10% эмбриональной телячьей сыворотки («Биолот», Санкт-Петербург), 0,3 мг/мл L-глутамина, или полную культуральную среду с добавлением 10 мкг/мл фитогемагглютина (ФГА) («Difco», Германия) для активации лимфоцитов. Клетки инкубировали в течение 18 ч при температуре 37 °С и 5% CO<sub>2</sub>. После отмывания клетки суспендировали ( $1 \cdot 10^6$  в 1 мл) в аннексиновом буфере, содержащем аннексин V, меченый FITC, и через 15 мин подвергали проточной цитофлуориметрии.

Анализ образцов клеточных суспензий проводили на проточном цитометре Epics XL («Beckman Coulter», Франция) с аргоновым лазером (длина волны 488 нм) на основе определения параметров малого углового светорассеяния (FSC), характеризующего размер клетки, бокового светорассеяния (SSC), характеризующего цитоплазматические и мембранные особенности клетки, и зеленой флуоресценции (флуоресцеин изотиоцианат – FITC – 530 нм). Проводился гейтинг исследуемой популяции клеток в координатах FSC и SSC. Затем данную популяцию клеток анализировали на наличие флуоресценции на основе гистограммы. Использовали автоматическое программное обеспечение и методы сбора и анализа данных с высоким разрешением (1024 канала) (рис. 1).

Для дифференцированной оценки реализации апоптоза CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов после культивирования мононуклеары отмывали и окрашивали 5 мкл стандартных моноклональных антител (МКАТ) к CD4 и CD8, меченных фикоэритрином (PE) («Caltag», США), в течение 30 мин. Затем клетки еще раз отмывали и ресуспендировали ( $10^6$  в 1 мл) в аннексиновом буфере («Caltag», США), содержащем FITC-меченный аннексин V. После 15 мин инкубации клетки подвергали двцветной цитофлуориметрии [Ярилин А.А. и соавт., 2000].

*Распределение здоровых доноров и пациентов с длительной антигенемией вируса клещевого энцефалита, хроническим вирусным гепатитом в соответствии с использованными методами исследования*

№	Методы исследования	Группы обследованных		
		Здоровые доноры	Пациенты с хроническим вирусным гепатитом	Пациенты с антигенемией вируса клещевого энцефалита
1	Определение количества лимфоцитов крови, экспрессирующих CD3-, CD4-, CD8-, CD22- и CD56-маркеры, цитохимическим методом	19	85	21
2	Оценка реализации апоптоза в аннексиновом тесте:			
	Цитофлуориметрическая оценка спонтанного и активационного апоптоза общей популяции лимфоцитов периферической крови	20	63	21
	Дифференцированная оценка апоптоза CD4 <sup>+</sup> -, CD8 <sup>+</sup> -лимфоцитов периферической крови в аннексиновом тесте с помощью проточной цитофлуориметрии	19	57	16
	Модуляция апоптоза in vitro:			
- лишением ростовых факторов	17	34	10	
- ингибированием топоизомеразы II	12	32	11	
- глюкокортикоидами	12	32	11	
3	Хромосомный анализ лимфоцитов периферической крови	10	54	19
4	Исследование механизмов регуляции апоптоза:			
	Оценка Fas-опосредованного пути апоптоза (определение количества FasR <sup>+</sup> - лимфоцитов периферической крови иммуноцитохимическим методом)	19	85	21
	Оценка TNF-опосредованного пути апоптоза:			
	- определение количества мембраносвязанного TNF-RI <sup>+</sup> -лимфоцитов периферической крови цитофлуориметрическим методом	17	10	10
	- определение продукции TNF-α лимфоцитами периферической крови методом ИФА	10	58	17
	- определение продукции растворимой формы TNF-RI лимфоцитами периферической крови методом ИФА	10	58	17
Оценка митохондриального пути апоптоза (цитофлуориметрическое определение количества лимфоцитов периферической крови со сниженным митохондриальным потенциалом)	10	21	16	
Оценка p53-зависимого пути апоптоза (определение активности системы репарации ДНК лимфоцитов периферической крови методом скинтилляционной радиометрии)	17	51	34	

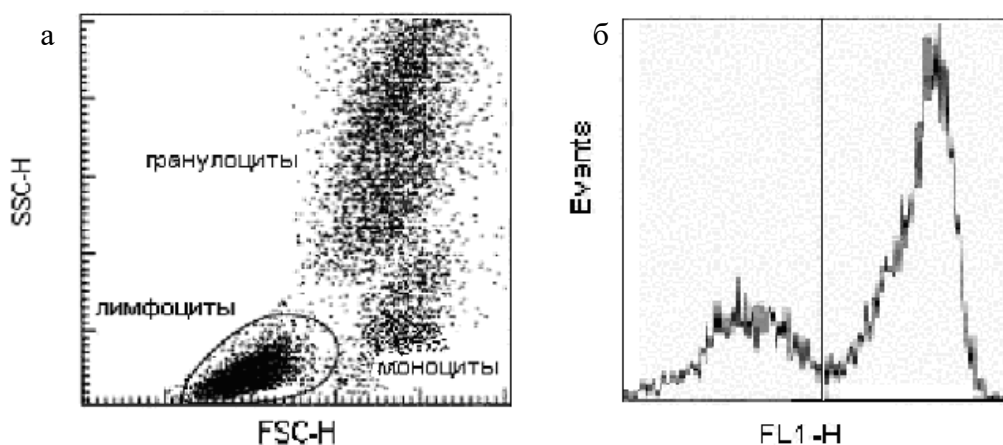


Рис. 1. Анализ апоптоза лимфоцитов периферической крови методом проточной цитофлуориметрии (окрашивание аннексином V-FITC)

а – принцип автоматического выделения гейта лимфоцитов по показателям малоуглового (FSC) и бокового (SSC) светорассеивания;

б – одномерная гистограмма интенсивности флуоресценции в гейте лимфоцитарных клеток по FL-1-каналу (слева от оси – несветящиеся клетки, справа – аннексин V-FITC-положительные лимфоциты)

В рамках диссертационной работы проводили оценку реализации апоптотического процесса лимфоцитов периферической крови у пациентов с носительством антигена TBEV, HBV и HCV, а также у здоровых доноров *in vitro* в условиях инкубации лимфоцитарных клеток с модуляторами апоптоза. Для этого в лунки планшета вносили суспензию выделенных мононуклеаров крови ( $2 \cdot 10^5$  на лунку), а также чистую среду RPMI-1640 без эмбриональной телячьей сыворотки, т.е. в отсутствии ростовых факторов, или полную культуральную среду с добавлением дексаметазона ("KRCA", Словения) в концентрации  $10^{-4}$  моль/мл, либо с добавлением этопозида ("Rhone-Poulenc Rorer", Франция) в концентрации  $10^{-6}$  моль/мл. Клетки инкубировали в течение 18 ч при температуре 37 °C и 5% CO<sub>2</sub>. Затем с помощью ФИТЦ-меченного аннексина V методом проточной лазерной цитометрии регистрировали апоптоз как указано выше.

Приготовление препаратов для хромосомного анализа лимфоцитов проводили по методу P.S. Moorhead et al. [1960]. Для оценки цитогенетического эффекта определяли общее количество aberrаций и весь их качественный спектр в соответствии с критериями мутагенного воздействия [Бочков Н.П. и соавт., 1972; Carrano A. V., Natarajan A. T., 1988]. Полученные результаты выражали в процентах.

Количество лимфоцитов, экспрессирующих Fas-рецептор (CD95), оценивали иммуноцитохимическим методом [Тотолян А.Н. и соавт., 2001] с использованием набора реагентов фирмы «Novocastra» (Великобритания).

Для определения экспрессии мембранной формы рецептора к фактору некроза опухоли- $\alpha$  I типа (TNF-RI) (CD120) лимфоцитами интактную и ФГА-стимулированную культуры клеток инкубировали с МКАТ к TNF-RI, мечен-

ными FITC («Immunotech», Франция), в течение 30 мин согласно протоколу фирмы производителя. С помощью проточного цитометра анализировали наличие зеленой флуоресценции FITC в гейте лимфоцитарных клеток.

Определение концентрации TNF- $\alpha$  и растворимого рецептора TNF- $\alpha$  (sTNF-RI) в супернатантах интактной и ФГА-стимулированной культур мононуклеаров осуществляли методом твердофазного иммуноферментного «сэндвичевого» анализа по инструкции, предлагаемой производителем («Procon», Россия и «Biosource», США, соответственно). Измерение оптической плотности полученных растворов проводили на микропланшетном фотометре Multiscan EX («ThermoLabSystems», Финляндия) при длине волны света 450 нм.

Изменение величины потенциала мембраны митохондрий ( $\Delta\psi_m$ ) клеток определяли с использованием набора «MitoScreen» («BD Pharmigen», США), ключевым реагентом которого является флуорохром 5,5',6,6'-тетрахлоро-1,1',3,3'-тетраэтилбензимидазолкарбоцианин йодид (JC-1). Окрашенные JC-1 лимфоциты анализировали на проточном цитометре Epics XL («Beckman Coulter», Франция), определяя процентное содержание клеток в гейтах неапоптотических (FL-2- и FL-1-свечение) и апоптотических клеток (FL-1-свечение).

Активность эксцизионной системы репарации ДНК лимфоцитарных клеток исследовали методом сцинтилляционной радиометрии [Дубинин Н.П., Засухина Г.Ф., 1975]. Измерение радиоактивности (имп/с) проводили на сцинтилляционном счетчике «Mark III» (США). Рассчитывали индекс стимуляции системы ДНК-репарации. Результаты выражали в условных единицах (усл. ед.).

Полученные в ходе исследования данные обрабатывали методами вариационной статистики. При анализе имеющихся выборок данных использовали гипотезу нормальности распределения (критерий Шапиро–Вилка). Для нормально распределенных выборок вычисляли средневывборочные характеристики: среднее арифметическое ( $\bar{X}$ ), среднее квадратичное отклонение ( $\sigma$ ), ошибку среднего ( $m$ ). Для выборок, распределение которых отличалось от нормального, рассчитывали медиану ( $Me$ ), первый и третий квартили ( $Q_1$ ,  $Q_3$ ). В случае отсутствия согласия данных с нормальным распределением для оценки различий между зависимыми выборками применялся непараметрический критерий Вилкоксона. Для оценки достоверности различий независимых выборок, не подчиняющихся критерию нормального распределения, использовали ранговый критерий Манна–Уитни. Различия считались достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$  [Лакин А.В., 1989]. С целью обнаружения связи между исследуемыми показателями проводили корреляционный анализ путем вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена ( $r$ ). Методом множественной регрессии были рассчитаны коэффициенты  $\beta$ , определяющие степень зависимости между исследуемыми показателями [Боровиков В.П., 2001]. Сравнение многомерных группировок производили с помощью дискриминантного анализа с использованием алгоритма пошагового отбора информативных признаков.

Статистическую значимость полученных дискриминантных функций оценивали с помощью  $\lambda$ -критерия Уилкса [Гланц С., 1999].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Знания о молекулярных механизмах регуляции апоптоза иммунокомпетентных клеток необходимы для оценки патогенетической значимости индукции или угнетения программированной клеточной гибели в условиях персистентной вирусной инфекции, что и стало посылком к выполнению исследований в данном направлении в нашей лаборатории. Основной целью этой работы явилось установление роли и молекулярных путей модуляции апоптоза лимфоцитов периферической крови в патогенезе персистентных вирусных инфекций. В связи с этим наше внимание было сфокусировано на дифференцированной оценке иммунофенотипического и цитогенетического статуса лимфоцитарных клеток, степени вовлеченности в спонтанный и активационный апоптоз, рецепторэкспрессирующей функции, уровня трансмембранного потенциала митохондрий и чувствительности лимфоцитов крови к стимуляторам программированной клеточной гибели с различными механизмами действия в условиях *in vitro*, полученных у пациентов с длительной персистенцией антигена ТБЕV, НВV и НСV.

Как известно, иммунная система участвует в формировании стратегии функционирования организма в новых условиях. В ответ на попадание во внутреннюю среду организма вирусных антигенов срабатывают врожденные и приобретенные механизмы иммунного ответа, направленные на ограничение и элиминацию инфекции. В случае же внутриклеточного проникновения вирусов ведущую роль, по общему признанию, отводят реакциям клеточного иммунитета [Кирдей Е.Г., 2000; Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 2000; Atkinson M., 2001].

Важнейшей особенностью адаптивной системы иммунитета является избирательное вовлечение в иммунный ответ только тех лимфоцитов, которые несут рецепторы, распознающие антигены [Ярилин А.А., 1999]. Этот процесс осуществляется с участием тесно связанных и взаимно усиливающих друг друга различных субпопуляций Т-лимфоцитов [Chisari F.V., 1995]. По результатам проведенного нами иммунофенотипического исследования, количественные сдвиги со стороны клеточного звена иммунной системы, выразившиеся в изменении содержания Т-клеток и дисбалансе основных субклассов лимфоцитов, были зарегистрированы у пациентов с хроническими инфекционными процессами, вызванными ТБЕV, НВV и НСV [Рязанцева Н.В. и соавт., 2002, 2003; Жукова О.Б. и соавт., 2003; Наследникова И.О. и соавт., 2005; Насырова Р.Ф. и соавт., 2006]. В целом полученные закономерности согласуются с мнением большинства авторов, занимающихся выявлением особенностей состояния иммунной системы в условиях развития хронического инфекционного процесса вирусной этиологии [Тотолян А.А., Фрейдлин И.С., 1999; Ярилин А.А., 1999;

Маммаев С.Н., 2002]. В наибольшей степени изменения ее функционирования затрагивают систему неспецифической резистентности и Т-клеточное звено. В-звено иммунитета в меньшей степени реагирует на изменения антигенного гомеостаза.

Известно, что одним из ключевых процессов, определяющих формирование антигенспецифической составляющей иммунной системы, а также реализацию ее эффекторных функций, является программированная клеточная гибель. В период развития иммунного ответа апоптоз многократно выступает как в роли регулятора общей численности клеточных популяций и их «правильного» распределения в тканях, так и в качестве механизма отбора при формировании клональной структуры популяции лимфоцитов [Ярилин А.А., 1996; Белушкина Н.Н. и соавт., 1998; Лушников Е.Ф., Абросимов Л.Ю., 2001]. Тонкий контроль за количеством лимфоцитов осуществляется с целью поддержания числа клеток памяти, элиминации инфицированных клеток и активированных иммуноцитов после реализации иммунного ответа. Однако в условиях длительной вирусной персистенции этот физиологический процесс испытывает активное модулирующее влияние и со стороны инфекционного фактора. На наш взгляд, изучение механизмов формирования хронической вирусной инфекции с позиции модуляции апоптоза иммунокомпетентных клеток позволит прогнозировать клиническое течение инфекционного процесса, а также предложить методы патогенетически обоснованной терапии, что несомненно повысит эффективность проводимых лечебных мероприятий. При этом особый интерес к состоянию программированной гибели лимфоцитарных клеток обусловлен не только тем фактом, что иммунная система принимает непосредственное участие в реализации инфекционного процесса, но и тем обстоятельством, что иммунокомпетентные клетки сами по себе являются мишенью для повреждающего действия вирусов, в частности возбудителей клещевого энцефалита, гепатита В и С [Апросина З.Г. и соавт., 1997; Lerat H. et al., 1998; Ратникова Л.И. и соавт., 2002].

В настоящем исследовании уровень апоптоза в популяции лимфоцитов периферической крови определяли путем установления экспрессии на наружном монослое плазматической мембраны молекул фосфатидилсерина методом проточной лазерной цитометрии с использованием FITC-меченного аннексина V [Eeden S.F. et al., 1999]. При изучении показателей, характеризующих степень выраженности программированной гибели лимфоцитарных клеток, у пациентов с длительной персистенцией антигена ТВЕV было зарегистрировано обогащение фракции лимфоцитов, подвергшихся спонтанному апоптозу, вне зависимости от клинических особенностей данного инфекционного процесса (рис. 2).

Обнаружено, что при хроническом вирусном гепатите В содержание аннексин-положительных клеток в интактной культуре соответствовало норме. Напротив, хроническое течение гепатита С сопровождалось снижением количества вступивших в апоптоз лимфоцитарных клеток (рис. 2), наиболее выра-



женным у больных с умеренной степенью активности HCV-гепатита [Жукова О.Б. и соавт., 2005]. Апоптотический ответ лимфоцитов крови у пациентов с микст-инфекцией, вызванной возбудителями гепатита В и С, носил характер, аналогичный таковому у больных с HCV-инфекцией, что свидетельствует о подавляющем влиянии HCV на иммунологическую реактивность по сравнению с вирусом гепатита В (рис. 2). При этом сравнительная оценка показателей, характеризующих реализацию физиологической танатогенной программы клетки при различной длительности инфекционного процесса, вызванного коинфекцией вирусов гепатита В и С, продемонстрировала достоверное снижение доли апоптотических лимфоцитов у больных с длительностью заболевания менее 5 лет по сравнению с более длительным сроком инфицирования (свыше 5 лет) [Жукова О.Б. и соавт., 2005]. Результаты проведенного корреляционного анализа продемонстрировали, что уровень активационного апоптоза лимфоцитов крови у больных хроническим гепатитом В+С оказался в обратной зависимости от значений гистологического индекса активности патологического процесса, характеризующего выраженность структурных изменений паренхимы печени ( $r = -0,65$ ;  $p = 0,03$ ).

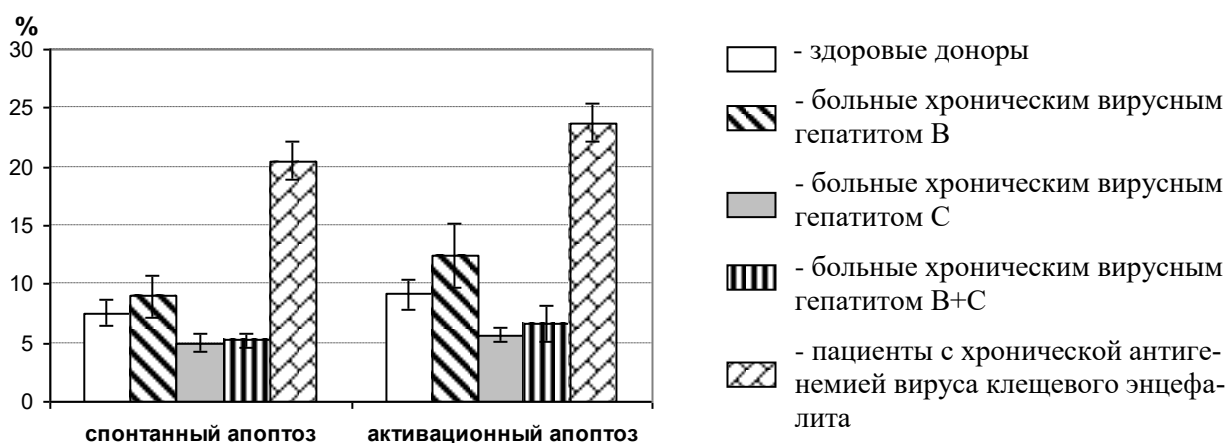


Рис. 2. Содержание апоптотических клеток в общей популяции лимфоцитов периферической крови у пациентов с персистентными вирусными инфекциями

Однозначная интерпретация полученных результатов представляется весьма затруднительной. С одной стороны, усиление апоптоза Т-лимфоцитов крови при клещевой нейроинфекции можно рассматривать как защитную реакцию организма, направленную на противостояние дальнейшей экспансии возбудителя [Маянский А.Н. и соавт., 1997; Сепиашвили Р.И. и соавт., 2000]. С другой стороны, чрезмерная гибель клеток, осуществляющих реализацию противовирусного иммунитета, может обуславливать дефект Т-звена и неадекватность иммунного ответа, что позволяет вирусу длительно сохраняться в организме с формированием хронического инфекционного процесса. Ингибирование апоптоза, наблюдаемое у больных хроническим гепатитом С и В+С, спо-

способствует выживанию вирусосодержащих клеток и имеет важное патогенетическое значение, так как препятствует элиминации инфектогенов [Маянский А.Н. и соавт., 1997].

Поскольку форма реакции клетки в ответ на антигенную стимуляцию определяет результативность иммунного ответа, наиболее значимой является оценка активационного апоптоза [Никонова М.Ф. и соавт., 1999]. Активация лимфоцитов периферической крови человека с помощью фитогемагглютинаина является общепризнанным методом, используемым *in vitro* для определения способности Т-лимфоцитов к пролиферации [Титов Л.П., 2004] и предоставляющим информацию о функциональном потенциале лимфоцитов. Проведенное нами исследование показало, что уровень апоптоза лимфоцитов, активированных митогеном ФГА, у пациентов с длительной антигемией вируса клещевого энцефалита превосходил соответствующие значения у здоровых лиц (рис. 2).

Такая реакция может быть связана с повышенной чувствительностью лимфоцитарных клеток к апоптогенным факторам в условиях данной вирусной инфекции. Показано, что активированные лимфоциты могут подвергнуться апоптозу при самых различных воздействиях: при недостатке факторов роста (IL-2 и IL-4 для Т- и В-клеток соответственно), в ответ на стимуляцию Т-клеточного рецептора [Smith C.A. et al., 1994], Fas-рецептора [Matiba B. et al., 1997], при действии ионизирующей радиации [Leist M., Jaattela M., 2001] и химиотерапевтических препаратов [Friesen C. et al., 1996], а также при поступлении  $Ca^{2+}$  [Caron-Leslie L.A., Cidlowski J.A., 1991]. Это обусловлено резким возрастанием количества Fas на наружной мембране и падением экспрессии антиапоптотических белков Bcl-2 и Bcl-X<sub>L</sub> при получении клеткой активационного сигнала [Russel J.H., 1995]. При хроническом гепатите С и В+С отмечались противоположные изменения (рис. 2). Уменьшение содержания лимфоцитов, вступивших в активационный апоптоз, у пациентов с HCV- и микст-гепатитом является, по-видимому, результатом поломки естественной реализации запрограммированной клеточной гибели. В итоге большинство клеток подвергается пролиферации, обеспечивая тем самым возможность персистенции вируса в организме. Таким образом, на фоне хронической вирусной инфекции иммунокомпетентные клетки претерпевают существенные структурные и функциональные изменения, направленность которых, по всей видимости, определяется молекулярными особенностями возбудителя, персистирующего в организме.

В процессе иммунного ответа осуществляется коррекция соотношения функциональных субпопуляций Т-клеток, где в качестве инструмента используется неравномерность вовлечения CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-клеток в пролиферацию и апоптоз [Sytwu H.K. et al., 1996; Никонова М.Ф. и соавт., 1999; Григорьева Т.Ю. и соавт., 2002]. В настоящее время известно, что при формировании противовирусного иммунитета пролиферация CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов способствует образова-

нию, главным образом, Т-хелперов I типа. Эти клетки, продуцируя IFN- $\gamma$  и IL-2, стимулируют функцию цитотоксических Т-лимфоцитов, а также принимают прямое участие в уничтожении возбудителей путем дистанционной индукции апоптоза инфицированных клеток и подавления репликации вирусов [Eckels D.D. et al., 1999]. По мнению многих авторов [Fan X.G. et al., 1998; Ferrari C., Penna A., 1998; Bramley A.M. et al., 1999; Фридлянд И. Ф. и соавт., 2002], хронизация инфекционного процесса связана с дифференцировкой CD4-позитивных лимфоцитов в Т-хелперы II типа, в результате чего развиваются активация неэффективного в данной ситуации гуморального звена иммунитета и подавление пролиферации Т-хелперов I типа, а следовательно, и цитотоксических Т-клеточных реакций.

Подобные нарушения были нами отмечены у пациентов с антигемией ТBEV: уровень спонтанной гибели CD4-экспрессирующих лимфоцитов значительно возрастал (рис. 3). Указанный факт отражает несостоятельность регуляторных механизмов иммунного ответа и может явиться одной из причин снижения численности CD4<sup>+</sup>-клеток, выявленного при иммунофенотипировании лимфоцитов, обуславливая тем самым длительное пребывание инфектогена в макроорганизме [Жукова О.Б. и соавт., 2003; Рязанцева Н.В. и соавт., 2003].

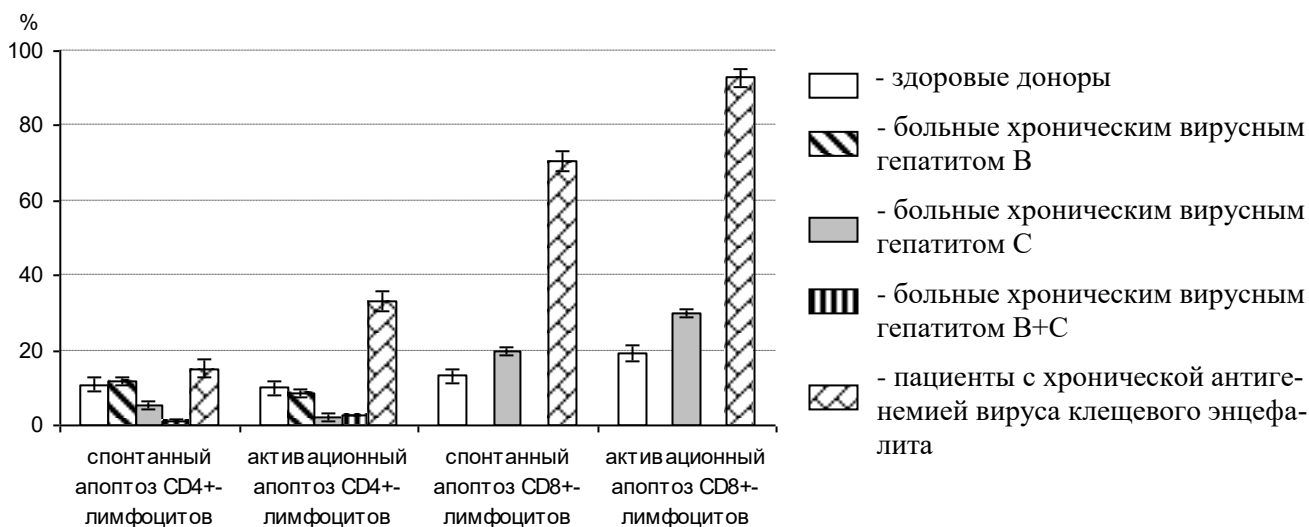


Рис. 3. Содержание апоптотических клеток в популяциях CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов периферической крови у пациентов с персистентными вирусными инфекциями

В то же время оценка уровней спонтанного и активационного апоптоза Т-хелперных клеток у больных хроническим гепатитом С и В+С показала, что на фоне обеднения Т-хелперной фракции численность подвергшихся апоптозу CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов снижалась (рис. 3). Выявленные изменения могут быть результатом срыва компенсаторных механизмов регуляции в системе иммунитета и преобладания антиапоптотического потенциала вируса над защитными клеточными реакциями. Сокращение численности CD4<sup>+</sup>-клеток, по-видимому, связано не с гибелью, а с нарушением пролиферации Т-клеток, дифференцировки

«наивных» Т-лимфоцитов либо с ослаблением экспрессии CD4-корцепторов [Мамаев С.Н., 2002].

На фоне хронического вирусного гепатита С CD8<sup>+</sup>-клетки обладают, по видимому, большей чувствительностью к апоптогенным стимулам, чем CD4<sup>+</sup>-лимфоциты. Так, у пациентов с хронической HCV-инфекцией с помощью аннексинового теста было обнаружено, что уровень спонтанного и активационного апоптоза в CD8<sup>+</sup>-субпопуляции лимфоцитарных клеток значительно превосходил аналогичные контрольные значения (рис. 3). У пациентов с клещевой нейроинфекцией при оценке реализации запрограммированной гибели CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов была зафиксирована аналогичная тенденция, что и при изучении CD4<sup>+</sup>-лимфоцитарной популяции: значения показателей, характеризующих апоптотическую гибель цитотоксических лимфоцитов, увеличивались (рис. 3).

При сопоставлении полученных результатов с данными других исследователей, указывающих на избирательность вступления в активационный апоптоз CD4<sup>+</sup>-клеток по сравнению с CD8<sup>+</sup>-лимфоцитами [Григорьева Т.Ю. и соавт. 2002], можно сделать вывод о нарушении чувствительности к индукции запрограммированной гибели Т-лимфоцитов CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-субклассов в условиях хронического инфекционного процесса.

Причины предпочтительного вступления в апоптоз цитотоксических лимфоцитов могут быть связаны с более интенсивной антигениндуцированной активацией данных клеток. Другим возможным механизмом обнаруженных изменений, по мнению Т.Ю. Григорьевой и соавт. [2002], является выраженная экспрессия Fas-рецептора на CD8<sup>+</sup>-клетках, а Fas-лиганда и внутриклеточного Bcl-2 – на CD4<sup>+</sup>-клетках.

Столь выраженные различия в чувствительности к индукции апоптоза, обнаруженные в субклассах CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов, определяют, по видимому, существенный дисбаланс в популяции активированных и эффекторных Т-клеток. Таким образом, нарушение реализации апоптотической программы лимфоцитов (особенно регуляторных и цитотоксических клеток) является, вероятно, одной из основных причин несостоятельности иммунного ответа при вирусной интервенции и формирования хронического инфекционного процесса.

Известно, что включение программы апоптоза клетки зависит от эффектов разнообразных внешних и внутренних факторов. Важным результатом взаимодействия регуляторов с про- и антиапоптотической активностью является способность организма адекватно модулировать состояние своих клеток в неблагоприятных условиях, нарушение которого всегда сопряжено со срывом адаптации и формированием патологического процесса. При достижении физиологической зрелости клетки иммунной системы становятся устойчивыми к индукции апоптоза благодаря отсутствию мембранного Fas-рецептора и экспрессии Bcl-2 и Bcl-X<sub>L</sub>. Однако описаны ситуации, при которых удается вызы-

вать апоптоз зрелых лимфоцитов *in vitro* [Huang D.C. et al., 1997; Chao D.T., Korsmeyer S.J., 1998].

В связи с вышеизложенным для нас представлялось актуальным дифференцированно оценить характер реакции лимфоцитарных клеток, полученных у здоровых доноров и пациентов с хроническим инфекционным процессом, на действие модуляторов программированной клеточной смерти *in vitro*. Как показало проведенное исследование, после инкубации лимфоцитов крови *in vitro* с дексаметазоном, этопозидом, а также при лишении сывороточных ростовых факторов апоптотическая реакция лимфоцитов претерпевала выраженные изменения (рис. 4).

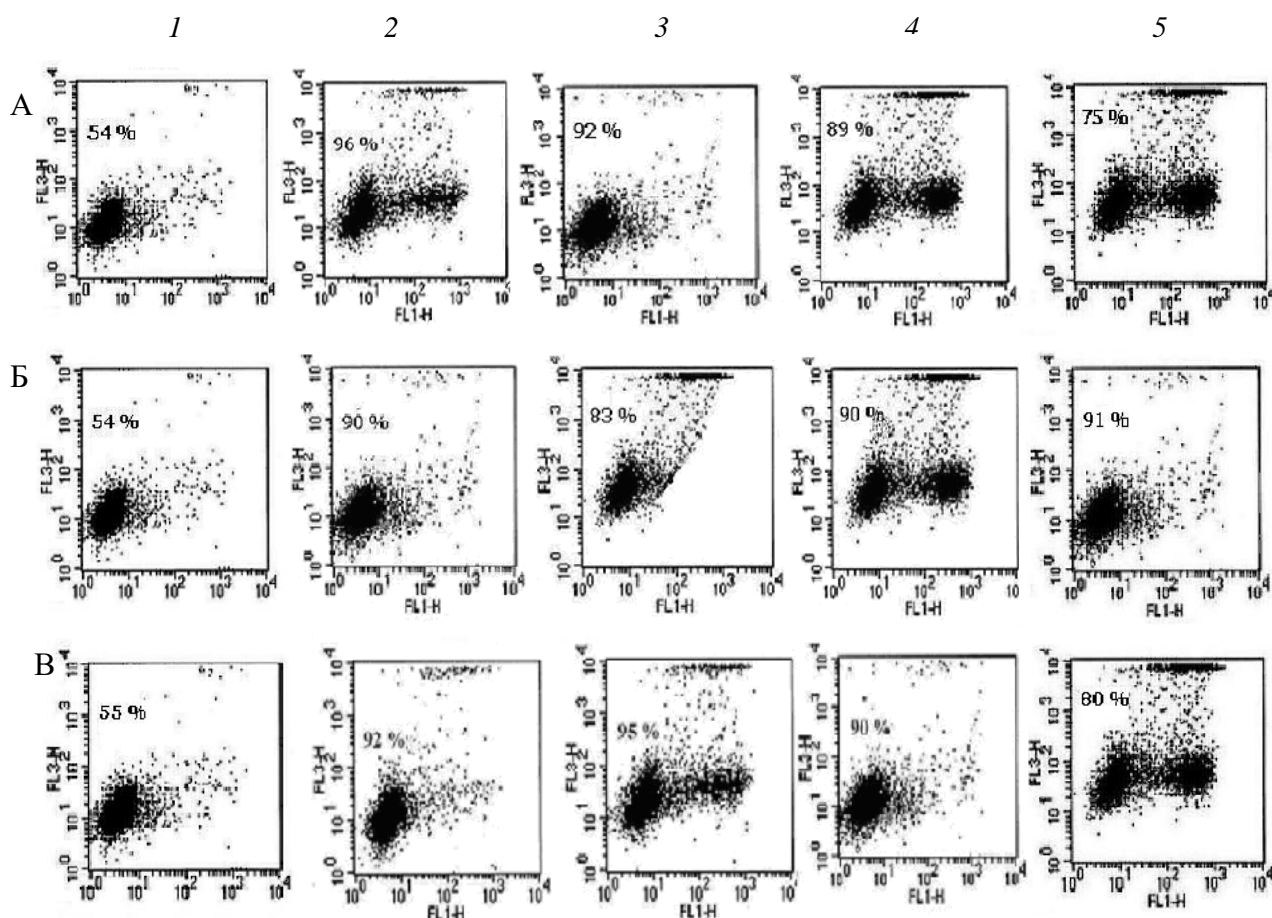


Рис. 4. Одномерная гистограмма проточно-цитометрического анализа, отражающая количество апоптотических лимфоцитов периферической крови у пациентов с персистентными вирусными инфекциями, культивированных в бессывороточной среде (А), в присутствии дексаметазона (Б) и этопозида (В): 1 – здоровый донор; 2 – больной гепатитом В; 3 – больной гепатитом С; 4 – больной гепатитом В+С; 5 – пациент с антигенемией вируса клещевого энцефалита

По нашим данным, культивирование лимфоцитов в бессывороточной питательной среде, лишенной ростовых факторов, индуцировало гибель более половины клеток здоровых доноров и более 75% лимфоцитарных клеток, полученных от пациентов с длительной вирусной персистенцией (рис. 4). Известно, что дефицит факторов роста воспринимается клеткой как сигнал к апоптозу:

происходят дефосфорилирование проапоптотического белка Bad, внедрение его в наружную мембрану митохондрий, высвобождение цитохрома C и последующая активация каспазы-9 через Araf-1-зависимый механизм [Festjens N. et al., 2004]. Кроме того, недостаток некоторых интерлейкинов, например IL-3, вызывает перемещение мономерного проапоптотического белка Bax из цитоплазмы в наружную мембрану митохондрий, что также приводит к высвобождению цитохрома C и гибели клетки [Kluck R.M. et al, 1997].

Важная роль в регуляции апоптоза отводится гормонам, в частности глюкокортикоидам. Известно, что чувствительность лимфоцитарных клеток к проапоптотическому действию глюкокортикоидов зависит от стадии клеточной дифференцировки. Пре-Т-клетки и пре-В-клетки, незрелые тимоциты, определенные субпопуляции зрелых лимфоцитов (NK-клетки, цитотоксические Т-лимфоциты), а также незрелые В-лимфоциты претерпевают апоптоз под влиянием глюкокортикоидов в физиологических дозах. Зрелые Т- и В-лимфоциты нечувствительны к действию глюкокортикоидов [Ярилин А.А., 2001]. Полученные результаты демонстрируют изменение чувствительности зрелых лимфоцитов к проапоптотическому влиянию стероидных гормонов, наиболее выраженное при вирусной персистенции (рис. 4). Подобная реакция иммунных клеток, вероятно, объясняется активацией лимфоцитов в условиях вирусной персистенции, что делает их чувствительными к индукции апоптоза внешними стимулами, в том числе и глюкокортикоидами. Кроме того, при вирусных инфекциях отмечается снижение концентрации различных цитокинов, в том числе IL-2, -3 и -5, которые являются физиологическими антагонистами апоптозиндуцирующего действия кортикостероидных гормонов [Потапнев М.П., 2002].

Индукция апоптоза может реализоваться вследствие возникновения источника сигнала внутри самой клетки. Такая ситуация складывается при накоплении разрывов ДНК в результате нарушения процессов репарации [Тронов Е.А., Константинов Е.М., 2000]. Одним из ферментов репарации ДНК является топоизомераза II. Этот белок участвует в формировании структур ДНК высшего порядка – суперспирализованных петель [Clifford V. et al., 2003]. При добавлении в культуральную среду цитостатического препарата этопозида, обладающего ингибирующей активностью в отношении топоизомеразы II, с последующей инкубацией в ней лимфоцитов крови здоровых доноров и пациентов с длительной вирусной персистенцией нами отмечалось увеличение численности лимфоцитарных клеток, находящихся на ранних стадиях реализации апоптотической программы гибели клетки, наиболее выраженное у обследованных лиц с хронической инфекцией (рис. 4).

При блокировании топоизомеразы II нарушаются процессы репарации поврежденных участков ДНК, происходит остановка митоза на стадии G<sub>2</sub>, что приводит к запуску апоптотического процесса в результате невозможности полноценной транскрипции генов, содержащих дефекты в матрице [Clifford V.

et al., 2003]. Кроме того, этопозид прямо инициирует каспазу-3, которая является важным участником апоптотического каскада [Ekert P.G., 1999; Ли С.-Х. и соавт., 2002; Clifford B. et al., 2003].

Таким образом, применение индукторов, независимо от молекулярного механизма их действия, приводило к достоверному увеличению числа лимфоцитарных клеток, вступивших в апоптоз *in vitro*. Повышенная по сравнению с нормой чувствительность лимфоцитов, полученных от пациентов с персистентными вирусными инфекциями, к разнообразным проапоптогенным стимулам свидетельствует о функциональной неполноценности иммунокомпетентных клеток, способствующей поддержанию хронического течения патологического процесса.

При анализе полученных результатов и сравнении их с данными других исследователей, занимающихся изучением программированной клеточной гибели в условиях хронических вирусных инфекций, было выявлено, что дисфункция иммунокомпетентных клеток проявляется также и нарушением реализации апоптоза, что обуславливает дизрегуляторные изменения в системе клеточного иммунного ответа и формирование иммунопатологических реакций (рис. 5).

Известно, что апоптоз является высокорегулируемым процессом. Вместе с тем сведения, указывающие на ведущие механизмы нарушения программированной гибели клетки в условиях вирусной персистенции, единичны и носят фрагментарный характер. Поиск ключевых молекулярных мишеней для управления различными сигналпередающими путями апоптоза определил следующий вектор настоящего исследования.

Решающую роль в регуляции иммунного ответа играет процесс программированной клеточной смерти, запускаемый через так называемые смертельные рецепторы, включающие программу гибели, в частности Fas, TNF-R и KILLER/DR-5, относящиеся к семейству рецепторов роста нервов [Owen-Schub L.V. et al., 1995; Сепиашвили Р.И. и соавт., 2000]. Fas-рецептор имеет экстраклеточный домен, обогащенный остатками цистеина, и цитоплазматический «домен гибели» [Williams G.T., 1994; Сепиашвили Р.И. и соавт., 2000; Бойчук С.В., Мустафин И.Г., 2001]. Естественным лигандом и источником сигнализации для Fas-R, приводящей к развитию апоптоза, является Fas-L. После активации рецептора лигандом его тримерный цитоплазматический домен передает сигнал на каспазу-8, которая инициирует ферментативный каскад каспаз [Nagata S., 1997; Казначеев К.С., 1999; Самуилов В.П. и соавт., 2000].

Изучая уровень апоптотической готовности иммунокомпетентных клеток периферической крови у пациентов с длительной антигенемией ТВЕВ, при HCV- и микст-инфекции, а также HBV-гепатите умеренной степени активности патологического процесса в ткани печени мы обнаружили с высокой степенью достоверности (по сравнению с нормой) увеличение абсолютного числа лимфо-

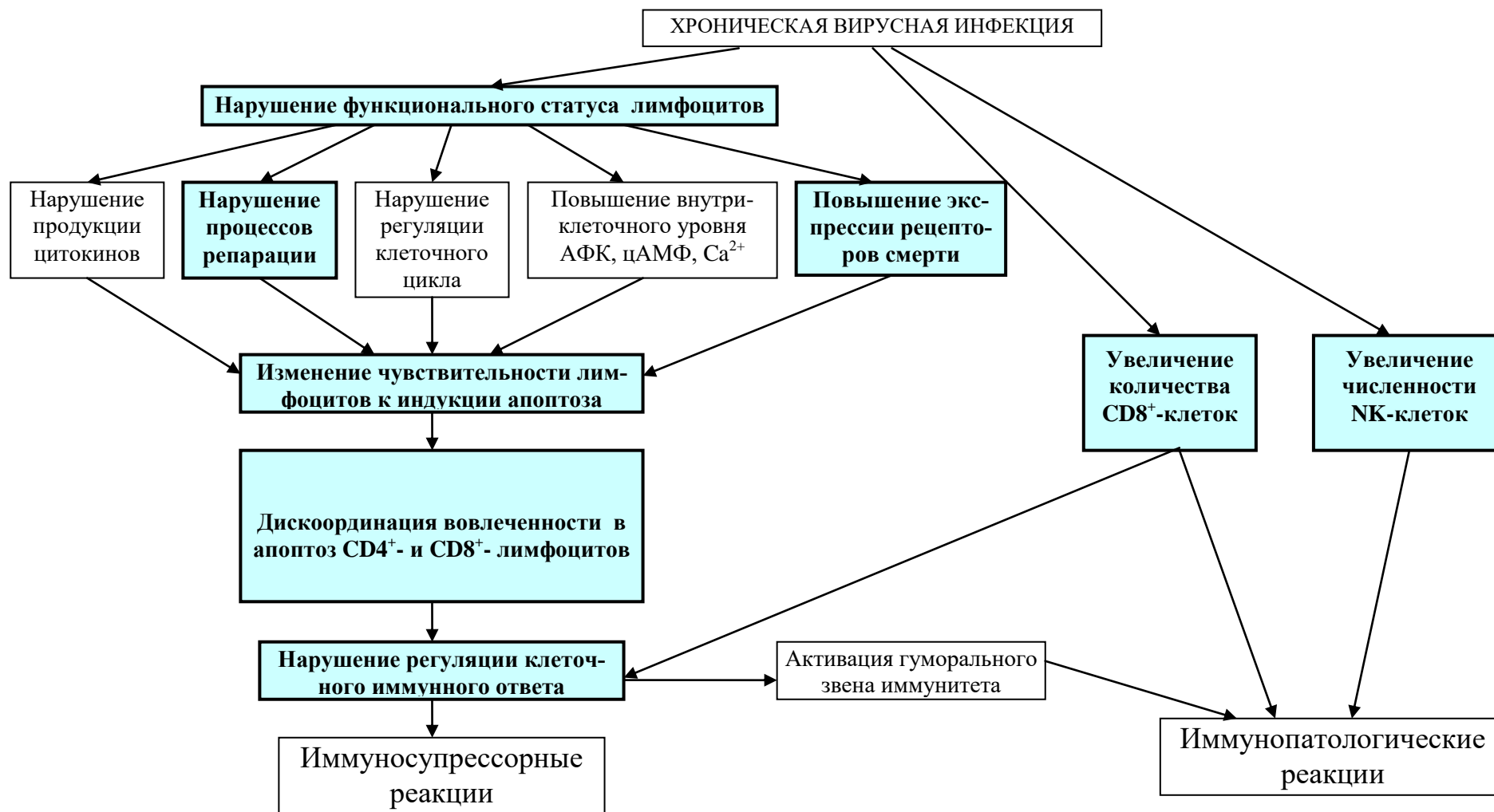


Рис. 5. Роль апоптоза лимфоцитов в регуляции иммунного ответа при хронической вирусной инфекции (по данным М.П. Исаевой и соавт., 1998; А.Н. Маянского и соавт., 1998; З.Г. Апросиной и соавт., 1999; Н.Н. Белушкиной, С.Е. Северина, 2001; Л.И. Ратниковой и соавт., 2002 и результатам собственных исследований (выделено))



цитов, несущих CD95-рецептор [Жукова О.Б. и соавт., 2003; Рязанцева Н.В. и соавт., 2003].

Интерпретируя полученные результаты, свидетельствующие о заинтересованности Fas-опосредованного пути, у пациентов с вирусной персистенцией, следует отметить, что повышение экспрессии CD95, по нашему мнению, является адекватной реакцией организма, направленной на элиминацию инфектогена.

Однако при сопоставлении полученных результатов с данными аннексинового теста становится ясно, что реализация Fas-индуцированной апоптотической гибели у больных хроническим вирусным гепатитом С и В+С оказывается заблокированной. Этот тезис подтверждается положительной корреляционной зависимостью между исследованными показателями ( $r=0,56$ ;  $p=0,031$  и  $r=0,51$ ;  $p=0,029$  – для пациентов с HBV-инфекцией и HCV-гепатитом, соответственно).

Механизмами изменения чувствительности лимфоцитов к Fas-индуцированному апоптозу на фоне вирусной инфекции являются дисбаланс между уровнями экспрессии мембранной и растворимой форм Fas-рецептора и Fas-L, а также дизрегуляция молекулярных процессов, возникающих после активации данного рецептора [Фильченков А.А. и др., 2002].

Как уже упоминалось, наибольшее значение система Fas имеет для клеток иммунной системы. Для изучения взаимосвязей уровня экспрессии маркера повышенной чувствительности к проапоптогенным сигналам (CD95) на циркулирующих лимфоцитах с изученными иммунологическими показателями (содержание Т-клеток и их субпопуляций, В-лимфоцитов и НК-клеток) и определения его значения в изменении клеточного состава иммунокомпетентной системы в зависимости от клинических проявлений хронической вирусной инфекции нами были проведены корреляционный и в последующем пошаговый регрессионный анализы.

В ходе установления зависимости между исследуемыми параметрами было показано, что у здоровых доноров число CD95<sup>+</sup>-клеток положительно коррелировало только с содержанием CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов ( $r=0,54$ ;  $p=0,029$ ). Это согласуется с общепринятыми представлениями о преимущественном использовании системы Fas-L/Fas CD4<sup>+</sup>-Th1-лимфоцитами, которым свойственна цитотоксичность [Nagata S., 1997]. Fas-опосредованный апоптоз также является основным путем элиминации Т-лимфоцитов после выполнения ими своей функции [Nagata S., Goldstein P., 1995; Уманский С.Р., 1996].

Результаты корреляционного анализа указанных показателей у пациентов с длительной вирусной персистенцией позволили выявить определенные связи, отличающиеся от аналогичных параметров, зарегистрированных у здоровых лиц. Так, у больных с выраженными клиническими симптомами хронической вирусной инфекции усиление готовности иммунокомпетентных клеток к апоптозу было сопряжено с возрастанием количества «естественных» киллеров

(CD56) ( $r=0,85$ ;  $p=0,024$ ). Выявленная зависимость, с одной стороны, свидетельствует о Fas-зависимой цитотоксичности, проявляемой НК-клетками, а, с другой, – о неэффективности CD56<sup>+</sup>-лимфоцитов на фоне низкой реактивности Т-клеточного звена иммунитета [Тотолян А.А., Фрейдлин И.С., 1999].

По сравнению с другими группами обследованных лиц, у пациентов с бессимптомным носительством антигена TBEV и у больных вирусным гепатитом В и С слабовыраженной степени активности было выявлено существенно большее число корреляционных связей. При регрессионном анализе было установлено, что из выявленных значимых параметров (CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup>) наибольший вклад в общий уровень проапоптотической готовности лимфоцитов периферической крови вносят CD3<sup>+</sup>-клетки ( $\beta=1,06$ ;  $p=0,12$ ). Полученный результат, согласно теории А.Н. Cheredeev et al. [1997], объясняется усиленной апоптотической гибелью Т-лимфоцитов крови, которую можно рассматривать, с точки зрения защитной реакции организма на присутствие вирусного инфектогена, как форму «альтруистического самоубийства», направленного на противостояние высокому мутационному потенциалу лимфоцитов и дальнейшей экспансии возбудителя [Roy D.J et al., 2000; Belanher C. et al., 2001; Bellows P.S. et al., 2002].

Значимую роль в регуляции рецепторного пути программированной клеточной гибели играет семейство фактора некроза опухоли (TNF) – лиганды и рецепторы. TNF- $\alpha$  – многофункциональный цитокин с выраженной плеiotропностью, продуцируется в малых количествах в находящихся в покое клетках, но становится одним из главных факторов, секретируемых активированными макрофагами и лимфоцитами. Этот цитокин играет ведущую роль в развитии как местных и общих системных воспалительных процессов, так и инфекционных заболеваний, особенно – при вирусной этиологии [Недоспасов С.А., 2003]. TNF- $\alpha$  регулирует интенсивность воспаления, иммунного ответа, активирует Т- и В-лимфоциты, НК, оказывает гепатотоксический и пирогенный эффекты, принимает участие в регуляции апоптоза, пролиферации клеток, повышает устойчивость к действию инфекционных факторов. Система TNF-рецептор вовлечена в сеть хемокинов, стимулирующих привлечение иммунных клеток в инфекционные очаги [Ягода А.В. и соавт., 2000; Анисимова Н.Ю. и соавт., 2003].

У всех обследованных нами пациентов с длительным носительством HBV, HCV и антигена TBEV отмечалось выраженное угнетение конституциональной и индуцированной способности мононуклеаров периферической крови продуцировать TNF- $\alpha$  по сравнению с аналогичными параметрами у здоровых доноров (рис. 6).

Снижение продукции TNF- $\alpha$  – ключевого провоспалительного цитокина, обладающего выраженным противовирусным потенциалом, – во многом обуславливает неэффективность иммунной защиты организма в ответ на действие

инфекта [Хаитов Р.М., 2001]. С одной стороны, ограничение продукции TNF- $\alpha$  моноклеарами в условиях длительной вирусной персистенции можно расценивать как реакцию системы иммунитета, направленную на предотвращение развития необратимого повреждения органов и тканей, обусловленного действием этого цитокина [Буеверов А.О., 2001; Ивашкин В.Т. и соавт., 2003]. С другой стороны, известен феномен защиты от апоптоза клеток, инфицированных HSV, HIV, аденовирусами, а снижение продукции TNF- $\alpha$  можно расценивать как способ предотвращения TNF-индуцированного апоптоза [Сепиашвили Р.И. и соавт., 2000].

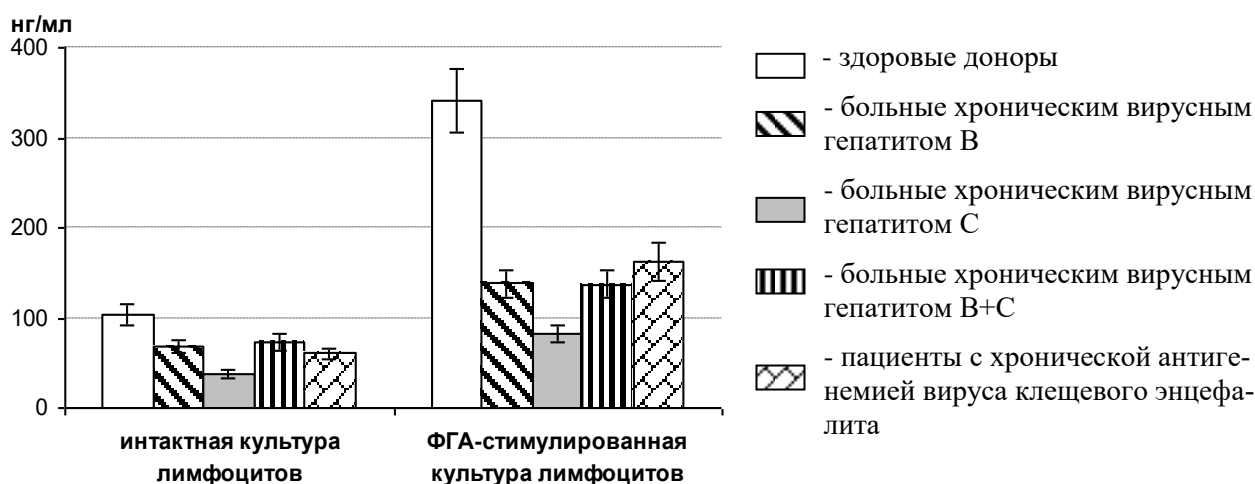


Рис. 6. Содержание TNF- $\alpha$  в супернатантах культур лимфоцитов, полученных у пациентов с персистентными вирусными инфекциями

Осуществление биологических эффектов TNF- $\alpha$  возможно после связывания его со специфическими высокоаффинными рецепторами: TNF-RI и TNF-RII. Основным эффектом TNF- $\alpha$  на одни клетки является активация транскрипционных факторов NF- $\kappa$ B и JNK, ведущих к индукции провоспалительных и иммуномодулирующих генов. В других клетках тримеризация TNF-рецептора ведет к запуску запрограммированной клеточной гибели. TNF- $\alpha$  при взаимодействии с рецептором TNF-RI, имеющим функциональную связь с каскадом сериновых каспаз, может вызывать апоптоз как инфицированных, так и не инфицированных вирусом клеток-мишеней [Анисимова Н.Ю. и соавт., 2003; Степанец О.В. и соавт., 2003].

Исследование, проведенное с использованием проточного цитофлуориметра, позволило определить низкое содержание TNF-RI-положительных клеток в интактной культуре лимфоцитов, полученных от пациентов с хроническими вирусными инфекциями, вызванными TBEV, HBV, HCV (рис. 7). Кроме того, в случае хронического гепатита В нами была установлена выраженная положительная корреляция между количеством клеток, несущих TNF-RI, и уровнем апоптотической гибели в общей лимфоцитарной популяции ( $r=0,97$ ;

$p=0,007$ ). G. Herbein и W.A. O'Brien [2000] отмечали аналогичную взаимосвязь экспрессии TNF-рецептора I типа с апоптозом инфицированных клеток при HIV-инфекции.

Рассматривая значение рецепторов в реализации биологической функции TNF- $\alpha$ , необходимо отметить роль их растворимых форм (sTNF-R). Известно, что цитокиновые рецепторы, так же как и сами цитокины, способны существовать не только в виде молекул, тесно связанных с мембраной клетки-продуцента, но и в форме циркулирующих в межклеточном пространстве молекул. Подобные рецепторы сохраняют в кровотоке способность связываться со свободными молекулами цитокинов вне клетки, препятствуя ассоциации цитокина с мембранными рецепторами непосредственно на клетке-мишени. Но это связывание не запускает эффекторные клеточные функции [Kim K. et al., 2000; Varash J. et al., 2003].

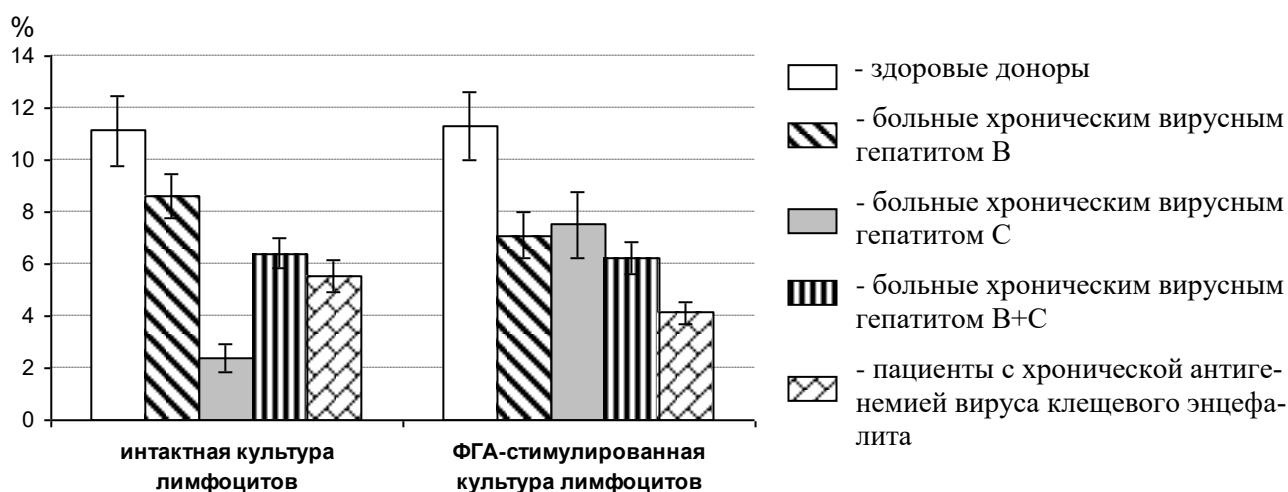


Рис. 7. Содержание лимфоцитов, экспрессирующих TNF-рецептор I типа, у пациентов с персистентными вирусными инфекциями

Известно, что растворимые рецепторы являются мощными регуляторами активности цитокинов [Heaney M., Golde D.W., 1998; Renz H., 1999]. Показано, что они могут как препятствовать связыванию цитокина с мембранными рецепторами и таким образом нарушать проведение сигнала, так и, выступая в роли переносчиков, защищать цитокины от разрушения протеазами, удлинняя время существования в системном кровотоке [Анисимова Н.Ю. и соавт., 2003; Царгородцева Т.М., Серова Т.И., 2003]. Некоторые растворимые рецепторы образуют с цитокинами комплексы, которые могут связываться на поверхности клеток с другими сигнальными молекулами и действовать синергично со свободными медиаторами [Heaney M., Golde D.W., 1998; Renz H., 1999].

Логично предположить, что одним из возможных механизмов снижения уровня TNF- $\alpha$  в культуральных жидкостях у обследованных пациентов с хроническими вирусными инфекциями, на наш взгляд, может быть возрастание содержания «ловушек» цитокинов, в роли которых могут выступать раствори-

мые формы их рецептора [Анисимова Н.Ю. и соавт., 2003]. В связи с этим нами была проведена оценка содержания в супернатантах культур моноклеарных лейкоцитов растворимого рецептора TNF- $\alpha$  с молекулярной массой 55 кДа. Анализ полученных данных показал, что вне зависимости от этиологического варианта исследуемые хронические вирусные инфекции сопровождались повышением конституциональной и ФГА-стимулированной продукции лимфоцитами sTNF-R *in vitro*. При этом наиболее выраженные изменения отмечались у больных с HCV- и HBV+HCV-гепатитом (рис. 8). Примечательно, что снижение способности иммунокомпетентных клеток к продукции TNF- $\alpha$  положительно коррелировало с увеличением содержания sTNF-R ( $r=0,71$ ;  $p=0,02$ ).



Рис. 8. Содержание растворимой формы TNF-рецептора I типа в супернатантах культур лимфоцитов, полученных от пациентов с персистентными вирусными инфекциями

В настоящее время обсуждаются различные причины возрастания концентрации растворимых рецепторов цитокинов в биологических жидкостях. Согласно многочисленным исследованиям, ведущую роль в повышении содержания sTNF-R может играть шеддинг белков с поверхности клеток в результате деструктивных процессов в плазматической мембране (интенсификация перекисного окисления липидов и, как следствие, – изменение упорядоченности и микровязкости липидного бислоя мембран, ведущие к модификации их структурных свойств). Подтверждением этого механизма послужило выявленное ранее в нашей лаборатории с использованием флуоресцентного липотропного зонда пирен возрастание микровязкости плазматической мембраны лимфоцитов у пациентов с хроническим течением вирусного гепатита и длительной антигемией TBEV [Рязанцева Н.В. и соавт., 2002; Панин Л.Е. и соавт., 2003; Новицкий В.В. и соавт., 2005]. Кроме того, имеются данные, что одна из причин возрастания шеддинга рецепторов с поверхности клеточных мембран может иметь вирусиндуцированный характер [Cohen M.C., Cohen S., 1996; Анисимова Н.Ю. и соавт., 2003]. Среди других возможных механизмов возрастания концентрации растворимых рецепторов цитокинов называют также оверэкс-

прессию альтернативно сплайсированных мРНК мононуклеарных лейкоцитов [Степанец О.В. и соавт., 2003].

В настоящее время считается общепризнанным, что одну из ключевых ролей в развитии и регуляции апоптотической программы в клетке играют митохондрии. На этих органеллах сосредоточено множество сигнальных путей: они образуют столь сложную систему взаимодействий, что во многих случаях механизмы действия того или иного сигнала не выяснены, а данные разных исследователей весьма противоположны [Винтер А.П., 2000; Tafani O.P. et al., 2000].

В первую очередь изменение функционирования митохондрий при апоптозе выражается в падении трансмембранного потенциала ( $\Delta\psi_m$ ) на внутренней мембране митохондрий и вне зависимости от вида индуктора апоптоза (токсины, неоптимальные условия культивирования, специфическое связывание с рецепторами (Fas, TNF-R, рецепторы глюкокортикоидов) или удаление облигатных факторов роста) [Kroemer G. et al., 1998; Tsujimoto Y., Shimizu S., 2000]. Вместе с падением  $\Delta\psi_m$  в митохондриях происходят более глубокие изменения, связанные с выраженным нарушением проницаемости мембран и выходом из межмембранного пространства различных, в том числе апоптогенных, факторов. Именно нарушение барьерной функции митохондриальных мембран является ключевым событием в развитии апоптоза. Этот процесс связан с образованием в митохондриальных мембранах гигантских пор перехода проницаемости, открытие которых приводит к драматическим последствиям для митохондрий и всей клетки [Hirata H. et al., 2003].

Повышение проницаемости мембраны приводит к нарушению метаболизма митохондрий, остановке синтеза митохондриальных белков и импорта белков, синтезированных в цитозоле. Возникает разобщение окислительного фосфорилирования, прекращается синтез АТФ, начинается гиперпродукция кислородных радикалов с последующим истощением восстановительного эквивалента [Cory S., Adams J.M., 2002; Hirata H. et al., 2003].

При оценке изменения величины  $\Delta\psi$  было выявлено, что при длительной антигенемии ТБЕV, хроническом вирусном гепатите С и В+С содержание лимфоцитов со сниженным уровнем  $\Delta\psi$  было увеличено (рис. 9), что свидетельствовало об активации митохондриального пути апоптоза при данных патологических состояниях. Вероятно, это вызвано воздействием на митохондрии активных форм кислорода и азота, усиленно нарабатываемых в результате активации свободнорадикальных реакций, сопровождающей течение инфекционного процесса [Маеда Х., Акаике Т., 1998]. У больных хроническим гепатитом В изменений потенциала митохондриальной мембраны лимфоцитов периферической крови выявлено не было (рис. 9).

Обобщая полученные данные о реализации апоптоза лимфоцитов и участии в этом процессе митохондриальных факторов, можно предположить, что

при хроническом гепатите С и В+С на ранних этапах программированной клеточной гибели происходит активация митохондриального пути апоптоза. Однако дальнейшая реализация программированной клеточной гибели оказывается заблокированной. Возможно, это связано с включением механизмов на этапе выхода проапоптогенных компонентов из межмембранного пространства митохондрий. Можно предположить, что при HCV- и HBV+HCV-инфекции не происходит активации каспазы-9, в результате чего нарушается сборка апоптосомы и дальнейшая реализация программированной клеточной гибели становится невозможной. Показано, что некоторые гепатотропные вирусы обладают способностью модулировать митохондриальный путь апоптоза, изменяя активность регуляторных белков семейства Bcl-2, контролирующего мембранный потенциал митохондрий. Так, сердцевинный протеин HCV ингибирует апоптоз путем повышения экспрессии Bcl-X<sub>L</sub> [Otsuca M. et al., 2002].

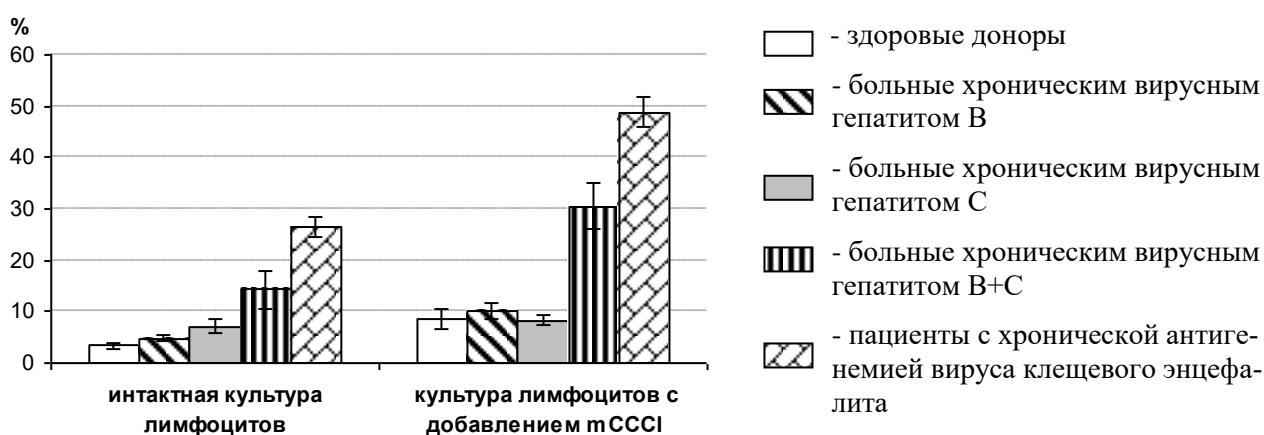


Рис. 9. Содержание лимфоцитов со сниженным уровнем трансмембранного потенциала митохондрий у пациентов с персистентными вирусными инфекциями

Напротив, у лиц с длительной антигемией TBEV уровень апоптоза лимфоцитов периферической крови находится в прямой зависимости от количества клеток со сниженным  $\Delta\psi_m$  ( $r=0,89$ ;  $p=0,01$ ), что подтверждает заинтересованность митохондриальных факторов в стимуляции гибели данных иммунцитов.

Для оценки потенциальных возможностей компонентов митохондриального пути апоптоза было предпринято экспериментальное исследование изменения состояния мембраны митохондрий при воздействии карбонилцианид-*m*-хлорофенилгидразона (mCCCl) *in vitro*. Данное вещество вызывает быструю деполяризацию митохондрий вследствие прямого переноса протонов липофильной молекулой mCCCl по всей поверхности внутренней митохондриальной мембраны [Macho V.C. et al., 1996], в результате чего развивается нарушение окислительного фосфорилирования. При культивировании лимфоцитов, полученных от здоровых доноров, пациентов с носительством антигена TBEV, а также больных хроническим гепатитом С и В+С, с ингибитором окислитель-

ного фосфорилирования mCCS1 нами было выявлено достоверное увеличение уровня лимфоцитов со сниженным  $\Delta\psi_m$  по сравнению с аналогичными параметрами в интактной культуре клеток, наиболее выраженное у обследованных лиц с инфекционной патологией (рис. 9). На наш взгляд, это может быть связано с дисбалансом в семействе белков Bcl-2, являющихся физиологическими регуляторами тока через митохондриальные поры перехода проницаемости.

Таким образом, в условиях длительной персистенции HBV и HCV, несмотря на запуск в иммунокомпетентных клетках начальных стадий апоптоза, сопровождающихся падением трансмембранного потенциала митохондрий, переход к реализации запрограммированной клеточной гибели нарушен, очевидно, на постмитохондриальном этапе. При хронической антигенемии возбудителя клещевой нейроинфекции высвобождение апоптогенных компонентов из межмембранного пространства в цитоплазму, по всей видимости, способствует дальнейшей интенсификации процесса апоптоза. После выброса митохондрией апоптозиндуцирующих факторов одни из них активируют каспазный каскад (цитохром C), другие – транспортируются в ядро (AIF), где запускают транскрипцию генов, контролирующих апоптоз [Susin S.A. et al., 1999].

Множество сигналов о состоянии клетки, целостности ее генома контролируется полифункциональным геном p53. Этот ген выполняет жизненно важные функции поддержания генетической стабильности в многоклеточном организме [Ichihara A., Tanaka K., 1995]. Активация p53 происходит в ответ на различные стрессорные и повреждающие воздействия. Ответственным за нарушение генетического контроля может стать интеграция вирусного генома в геном клетки-мишени [Сингер М., Берг П., 1998; Антонов П.В., Цинзерлинг В.А., 2001; Zhang Y. et al., 2002].

Учитывая, что модуляция апоптоза при вирусных инфекциях может быть связана с изменением активности p53-опосредованного пути апоптоза, нами была предпринята попытка оценить цитогенетический статус лимфоцитов периферической крови при вирусных инфекциях, обладающих лимфотропностью и имеющих склонность к пролонгированному течению. Используя метод подсчета хромосомных aberrаций в метафазных пластинках, окрашенных рутинным способом, было установлено, что у пациентов с антигенемией TBEV и хроническим течением инфекции умеренной степени активности, вызванной гепатотропными вирусами HBV и HCV, имеются нарушения структурной организации хромосомного аппарата клетки. Эти изменения характеризовались увеличением частоты повреждений хромосом у пациентов с хронической персистенцией антигена вируса клещевого энцефалита вне зависимости от клинических особенностей. При этом анализ типов aberrаций показал, что во всех исследованных группах основную часть структурных нарушений составили одиночные и парные фрагменты [Новицкий В.В. и соавт., 2003; Рязанцева Н.В. и соавт., 2003, 2004, 2006]. В ходе сравнительного исследования не было уста-



новлено связи между количеством клеток со структурными нарушениями хромосомного аппарата и возрастом, полом пациентов, а также между видовой принадлежностью возбудителя и спектром aberrаций хромосом, что свидетельствует о неспецифичности некоторых цитогенетических эффектов, обусловленных воздействием различных инфекционных агентов. Однако следует отметить, что примененный нами способ гомогенной окраски позволяет отметить лишь грубые повреждения хромосом и делает невозможным определение точной локализации участков их разрывов.

Ранее aberrации хромосом в виде одиночных фрагментов были выявлены при цитогенетическом анализе лимфоцитов периферической крови у больных полиомиелитом [Bhatnagar A. et al., 1984], инфекционным мононуклеозом, вызванным Эпштейна–Барр-вирусной инфекцией [Уразова О.И. и соавт., 2001, 2002], гриппом [Ильинских Н.Н., 1978] и корью [Bernard R. et al., 1970; Авакова А.К., Рапопорт Р.И., 1971]. Эти данные наводят на мысль о том, что при различных вирусных инфекциях факторы цитогенетической нестабильности имеют одинаковую природу и являются неспецифическим следствием действия подавляющего большинства вирусов.

В настоящее время установлено, что цитогенетические нарушения при действии инфекционного агента на структуру хромосом в клетках-мишенях могут быть обусловлены интеграцией нуклеиновой кислоты вируса в клеточную ДНК [Ohshima K. et al., 1997], высвобождением лизосомальных ферментов [Sakakura C. et al., 1999], интенсификацией процессов свободно-радикального окисления белков, липидов и нуклеиновых кислот [Маеда Х., Акаике Т., 1998]. Известно также, что повреждающее действие мутагенного фактора на клетки макроорганизма определяется не только характером и степенью выраженности вызываемых им хромосомных нарушений, но и эффективностью систем репарации, обеспечивающих поддержание цитогенетической нормы [Ильинских Н.Н. и соавт., 1992; Засухина Г.Д., Синельщикова Т.А., 1993].

Возможно, что недостаточная функциональная активность систем «слежения» и «поддержания» генетического постоянства организма и приводит к феномену нестабильности генома при вирусных инфекциях [Preston P.J., 1982; Ильинских Н.Н. и соавт., 1992]. В этом случае вирус, как генотоксический фактор, может обуславливать накопление в организме большого числа генетически дефектных клеток, функциональная неполноценность которых способна вызвать развитие того или иного патологического процесса [Ильинских Н.Н. и соавт., 1990].

При исследовании способности лимфоцитов восстанавливать повреждения клеточного генома, вызванных ультрафиолетовым облучением, нами было выявлено, что у пациентов с антигемией ТВЕV индекс стимуляции системы эксцизионной репарации ДНК, отражающий процесс застройки поврежденной матрицы этой молекулы, составил  $1,25 \pm 0,15$  усл. ед., при хронической HBV-

инфекции –  $1,16 \pm 0,42$  усл. ед., у больных гепатитом С –  $1,03 \pm 0,10$  усл. ед., у лиц с микст-гепатитом В+С –  $1,10 \pm 0,11$  усл. ед., что было достоверно ниже такового у лиц контрольной группы ( $1,91 \pm 0,12$  усл. ед.,  $p < 0,05$  во всех случаях). Установление данного факта позволяет говорить о том, что иммунокомпетентные клетки при хронических формах инфекций, вызванных возбудителями гепатитов и клещевого энцефалита, обладают повышенной чувствительностью к мутагенным воздействиям.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что развитие вирусных инфекций, индуцируемых способными к пролонгированной персистенции возбудителями клещевого энцефалита, гепатита В и С, сопровождается явлениями выраженной цитогенетической нестабильности иммунокомпетентных клеток, регистрируемых на молекулярном (ДНК-репарационный анализ) и клеточном (хромосомный анализ) уровнях организации живых систем.

В условиях накопления нерепарированных разрывов ДНК происходит активация экспрессии гена p53 [Lowe S.W. et al., 1993]. Блок клеточного цикла в фазах G<sub>1</sub> и G<sub>2</sub> до репликации ДНК и митоза соответственно делает возможной репарацию и тем самым предотвращает появление мутантных и анеуплоидных клеток. Если же активность репарационных систем недостаточна и повреждения ДНК сохраняются, как в нашем случае у пациентов с вирусной персистенцией, то такие клетки должны быть элиминированы путем апоптоза [Белушкина Н.Н. и соавт., 1998]. Учитывая факт ингибирования реализации апоптотической программы лимфоцитарных клеток у больных хроническим вирусным гепатитом С и В+С, можно предположить наличие дизрегуляторных изменений p53-опосредованного пути.

Таким образом, проведенное исследование позволило уточнить ключевые молекулярные механизмы нарушения реализации запрограммированной гибели лимфоцитов в условиях развития хронической вирусной инфекции (рис. 10). Установлено, что при длительной антигенемии ТBEV интенсификации запрограммированной гибели лимфоцитов крови способствуют повышение экспрессии Fas-рецептора, высвобождение апоптогенных компонентов из межмембранного пространства митохондрий и цитогенетическая нестабильность, а значит, заинтересованность p53-зависимых механизмов. Хронический вирусный гепатит В сопровождается дизрегуляторными изменениями реализации апоптоза лимфоцитов системе TNF- $\alpha$  и цитогенетическими нарушениями, что указывает на функциональную неполноценность иммунокомпетентных клеток при данной патологии. В условиях HCV- и HBV+HCV-инфекции, несмотря на запуск в лимфоцитах начальных стадий апоптоза, сопровождающихся падением трансмембранного потенциала митохондрий, переход к реализации запрограммированной клеточной гибели нарушен, очевидно, на постмитохондриальном этапе. При хроническом вирусном гепатите С и В+С отмечена дизрегуляция ядерного и рецепторного путей апоптоза, опосредованных

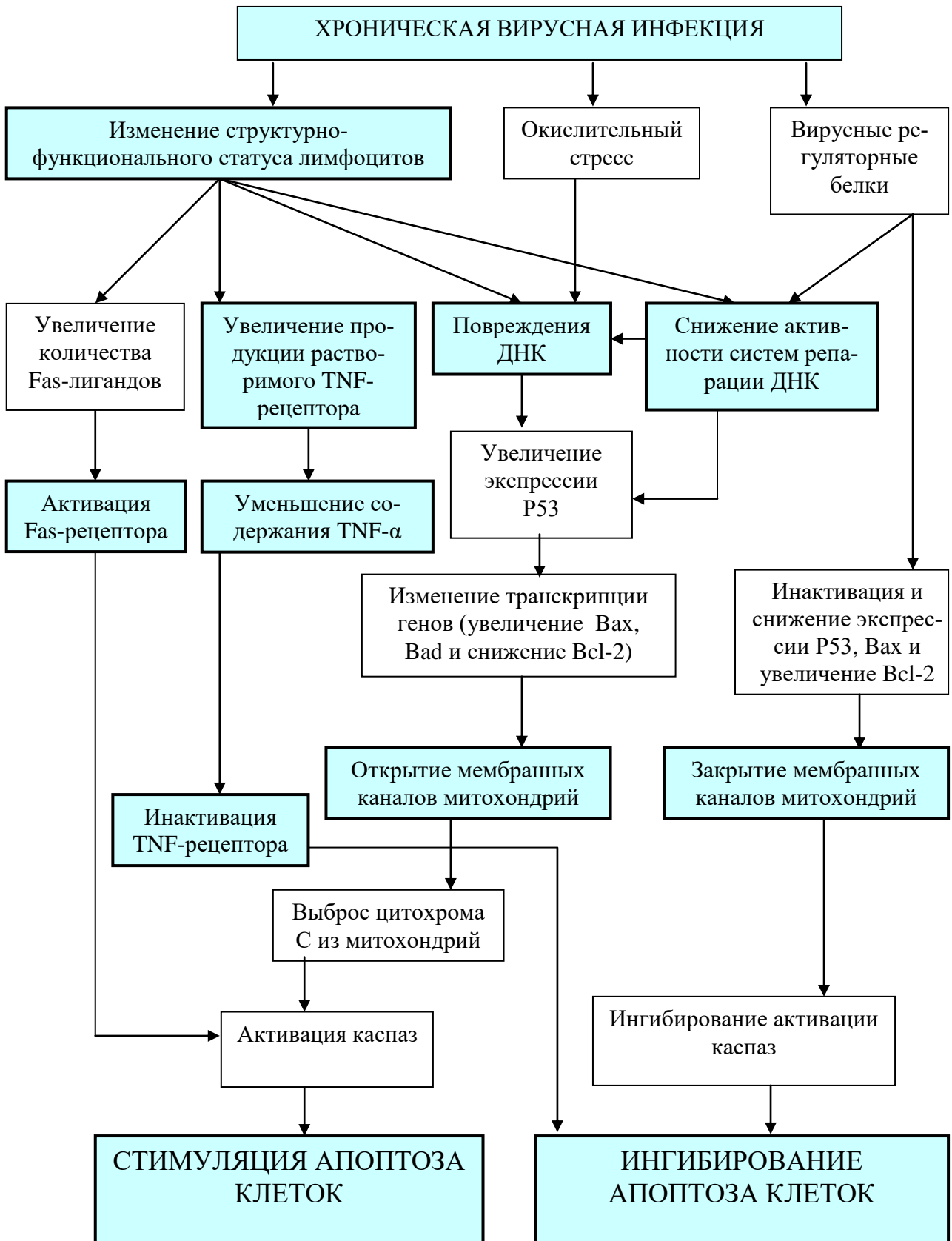


Рис. 10. Схема молекулярной дисрегуляции апоптоза лимфоцитов при хронических вирусных инфекциях (по данным Tanaka M. et al., 1997; Fliborg J.Jr. et al., 1999; Roy D.J. et al., 2000; Bellows D.S. et al., 2002; Ndolo T. et al., 2002 и результатам собственных исследований (выделено))

TNF- и Fas-рецепторами.

Подводя итог, следует отметить, что при хронической вирусной инфекции исход модуляции программированной гибели лимфоцитарных клеток неоднозначен, поскольку опосредован иммунной реакцией на присутствие инфектогена. Тем не менее дизрегуляция апоптоза лимфоцитов вносит значительный вклад в генез дисфункции иммунной системы при данной патологии. Дальнейшее изучение проблемы хронизации инфекционного процесса вирусной этиологии должно быть сфокусировано на всестороннем исследовании тонких молекулярных механизмов дизрегуляции апоптотической программы иммунокомпетентных клеток.

## ВЫВОДЫ

1. Одним из основных звеньев иммунопатогенеза персистентных вирусных инфекций, вызванных возбудителями клещевого энцефалита, гепатита В и С, является нарушение реализации программированной гибели лимфоцитов.

2. Дисбаланс клеточного звена иммунитета при персистентных вирусных инфекциях сопряжен с ингибированием апоптоза лимфоцитов у пациентов с хроническим вирусным гепатитом С и микст-инфекцией В+С, со стимулированием апоптотической гибели лимфоцитарных клеток – у пациентов с длительной антигенемией вируса клещевого энцефалита.

3. При хронических инфекциях, вызванных возбудителями клещевого энцефалита и гепатита С, дискоординировано вовлечение в апоптоз CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов с преобладанием программированной гибели цитотоксических клеток, что определяет характер иммунологических расстройств.

4. Лимфоциты, полученные от пациентов с персистентными вирусными инфекциями, характеризуются повышенной чувствительностью к апоптоз-модулирующим факторам с различными механизмами действия (глюкокортикоидные гормоны, ингибиторы ДНК-топоизомеразы, дефицит сывороточных ростовых факторов) *in vitro* по сравнению с нормой, что свидетельствует об истощении их резервного потенциала.

5. При хронической антигенемии вируса клещевого энцефалита, хроническом гепатите В, С и В+С повышено содержание Fas-положительных лимфоцитов периферической крови. Готовность лимфоцитарных клеток к индукции апоптоза наиболее выражена при бессимптомном носительстве антигена вируса клещевого энцефалита и у пациентов с хроническим гепатитом С слабовыраженной степени активности.

6. Нарушение реализации программированной гибели лимфоцитов крови при хронических инфекциях, вызванных вирусами гепатита В и С, клещевого энцефалита, сопряжено с дизрегуляцией системы фактора некроза опухоли

альфа и его рецептора (снижение содержания TNF- $\alpha$  в супернатантах интактных и стимулированных культур мононуклеарных лейкоцитов, угнетение презентации на мембране лимфоцитов рецептора фактора некроза опухоли I типа на фоне увеличения продукции его растворимой формы).

7. Для длительной антигенемии вируса клещевого энцефалита, хронического гепатита С и В+С характерно стимулирование митохондриального пути апоптоза лимфоцитов крови, наиболее выраженное при протонофор-индуцированной деполяризации мембраны митохондрий клеток, полученных от пациентов с микст-инфекцией В+С.

8. Хроническое течение вирусных инфекций сопровождается явлениями цитогенетической нестабильности лимфоцитов крови, проявляющимися структурными хромосомными абберациями и снижением активности системы эксцизионной репарации ДНК клеток, что свидетельствует о нарушении р53-зависимых механизмов программированной клеточной гибели.

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Зависимость репарационной активности лимфоцитов от клинической формы клещевого энцефалита // Тезисы докладов Международного симпозиума «Успехи современного естествознания», г. Сочи, 8-10 октября 2002 г. - Москва, 2002. – С. 307 (в соавт. с Рязанцевой Н.В., Новицким В.В., Плотниковой Н.Н., Токаревой Н.В.).

2. Влияние длительной персистенции вируса клещевого энцефалита на активность репарационной системы ДНК лимфоцитов периферической крови // Сборник докладов 5-го Конгресса «Современные проблемы аллергологии, иммунологии и иммунофармакологии», г. Москва, 12-14 ноября 2002 г. – Москва, 2002. – Т. 2. - С. 341 (в соавт. с Плотниковой Н.Н., Рязанцевой Н.В., Новицким В.В., Лепехиным А.В., Севостьяновой Н.В.).

3. Цитогенетический статус лимфоцитов периферической крови при длительной персистенции вируса клещевого энцефалита // Сборник научных трудов Всероссийской научной конференции «Нервно-психическое утомление человека в современных условиях», г. Карачаевск, 13-15 ноября 2002 г. – С. 61 (в соавт. с Михайловой О.В., Пироговой Н.П., Мельниковой А.П.).

4. Структурные и функциональные особенности лимфоцитов у пациентов с хроническим носительством антигена вируса клещевого энцефалита // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2002. – Т. 134, № 11. – С. 547-550 (в соавт. с Рязанцевой Н.В., Новицким В.В., Пироговой Н.П., Лепехиным А.А., Токаревой Н.В., Севостьяновой Н.В.).

5. Вирусная персистенция: иммунологические и молекулярно-генетические аспекты патогенеза // Бюллетень сибирской медицины. – 2003. – №4. – С. 113-119 (в соавт. с Рязанцевой Н.В., Новицким В.В.).

6. Хронический гепатит В: структура, метаболизм и цитогенетические особенности // Экспериментальная и клиническая медицина. – 2003. - №2. – С. 64-67 (в соавт. с Новицким В.В., Рязанцевой Н.В., Наследниковой И.О., Токаревой Н.В., Антошиной М.А., Белоконь В.В., Миноченко Ю.В., Томсон Ю.В., Комаровой Т.С., Чечиной О.Е., Чернецкой Н.Н.).

7. Роль иммунофенотипических и цитогенетических изменений лимфоцитов крови в механизмах хронизации вирусной инфекции // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2003. - №6. – С. 23-27 (в соавт. с Рязанцевой Н.В., Новицким В.В., Ткаченко С.Б., Лепехиным А.В., Белобородовой Э.И., Токаревой Н.В., Хлаповым А.П.).

8. Цитогенетика лимфоцитов периферической крови у пациентов с персистенцией вируса клещевого энцефалита // Бюллетень СО РАМН. – 2003. – Т. 110, №4. – С. 66-69 (в соавт. с Новицким В.В., Рязанцевой Н.В., Лепехиным А.В., Пироговой Н.П., Михайловой О.В., Плотниковой Н.Н., Токаревой Н.В., Наследниковой И.О., Хлаповым А.П.).

9. Активность ДНК-репарационной системы лимфоцитов периферической крови у пациентов с хронической вирусной персистенцией // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2003. - №12. – С. 43-46 (в соавт. с Рязанцевой Н.В., Новицким В.В., Ткаченко С.Б., Чечиной О.Е., Михеевым С.Л., Литваком М.М., Токаревой Н.В.).

10. Состояние системы репарации ДНК лимфоцитов периферической крови человека при хронической персистенции вирусов гепатита В и С // Сборник научных статей, докладов и тезисов 58-й межвузовской научной конференции молодых ученых и студентов, посвященной 100-летию В.В. Парина. - Екатеринбург, 2003.- С. 145 (в соавт. с Рязанцевой Н.В., Новицким В.В., Чернецкой Н.Н., Токаревой Н.В.).

11. Хронический вирусный гепатит С: структурно-метаболический и цитогенетический статус лимфоцитов // Материалы VI Российского съезда врачей-инфекционистов, г. Санкт-Петербург, 29-31 октября 2003. – СПб., 2003. – С. 268-269 (в соавт. с Наследниковой И.О., Рязанцевой Н.В., Токаревой Н.В., Антошиной М.А., Белоконь В.В., Миноченко Ю.В., Чечиной О.Е.).

12. Изменения цитогенетического статуса лимфоцитов периферической крови при хронических HBV- и HCV-инфекциях // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии. – 2004. – Т.14, №1. – С. 37-40 (в соавт. с Рязанцевой Н.В., Белобородовой Э.И., Новицким В.В., Ткаченко С.Б., Белобородовой Е.В., Токаревой Н.В., Михеевым С.Л.).

13. Апоптоз лимфоцитов крови у пациентов с хронической персистенцией вирусов // Межгородская конференция «Актуальные проблемы патофизиологии», г. Санкт-Петербург, 15-16 апреля 2004 г. – СПб., 2004. – С. 27-29 (в соавт. с Рязанцевой Н.В., Чечиной О.Е., Литваком М.М., Михеевым С.Л., Наследни-

ковой И.О., Мельниковой А.П., Антошиной М.А., Ермолаевой Е.С., Хлаповым А.П., Пигузовой Е.А.).

14. Патофизиология иммунных нарушений при хронических вирусных гепатитах // Вторая международная конференция «Патофизиология и современная медицина», г. Москва, 22-24 апреля, 2004 г. – Москва, 2004. – С. 154-155 (в соавт. с Рязанцевой Н.В., Новицким В.В., Михеевым С.Л., Мельниковой А.П., Наследниковой И.О., Чечиной О.Е., Литваком М.М., Ермолаевой Е.С., Токаревой Н.В.)

15. Роль нарушений иммунофенотипического профиля лимфоцитов крови в формировании хронической антигенемии вируса клещевого энцефалита // Материалы Всероссийская конференция «Компенсаторно-приспособительные процессы: фундаментальные, экологические и клинические аспекты», г. Новосибирск, 5-7 октября 2004 г.– Новосибирск, 2004. – С.86-87 (в соавт. с Чечиной О.Е., Рязанцевой Н.В., Новицким В.В., Зима А.П., Литваком М.М., Михеевым С.Л., Ермолаевой Е.С., Ковалевой Н.П., Кулагиной И.В., Радзивил Т.Т.).

16. Состояние системы эксцизионной репарации ДНК у жителей г. Томска // Сборник научных работ «Актуальные проблемы биологии, медицины и экологии». – Томск, 2004. – Т.3, №1. – С. 23 (в соавт. с Плотниковой Н.Н., Мельниковой А.П., Рязанцевой Н.В., Михеевым С.Л., Литваком М.М., Хлаповым А.П., Ермолаевой Е.С.).

17. Хронические вирусные гепатиты – актуальная проблема медико-социального значения // Там же. - Т.3, №2. – С. 347 (в соавт. с Мельниковой А.П., Рязанцевой Н.В., Наследниковой И.О., Миноченко Ю.В., Насыровой Р.Ф., Чечиной О.Е., Белоконь В.В., Антошиной М.А.).

18. Иммунофенотипические особенности лимфоцитов крови при длительной вирусной персистенции // Сборник научных работ VI конгресса с международным участием «Паллиативная медицина и реабилитация в здравоохранении», Турция, г. Анталия, 24-30 апреля 2004 г. – Паллиативная медицина и реабилитация. – 2004. - №2. – С. 29-30 (в соавт. с Наследниковой И.О., Рязанцевой Н.В., Мельниковой А.П., Чечиной О.Е., Миноченко Ю.В., Михеевым С.Л., Литваком М.М., Ермолаевой Е.С.).

19. Молекулярно-генетические механизмы хронизации вирусной инфекции // III российский конгресс по патофизиологии с международным участием «Дизрегуляторная патология органов и систем (экспериментальная и клиническая патофизиология)», Москва, 9-12 ноября 2004 г. - Москва, 2004. - С.142 (в соавт. с Рязанцевой Н.В., Новицким В.В., Наследниковой И.О., Мельниковой А.П., Белобородовой Е.В.).

20. Закономерности изменений цитокинпродуцирующей способности лимфоцитов при хроническом вирусном гепатите // Там же. - С. 72 (в соавт. с Наследниковой И.О., Рязанцевой Н.В., Новицким В.В., Мельниковой А.П., Белобородовой Е.В., Белоконь В.В., Антошиной М.А., Томсон Ю.В.).

21. Молекулярно-генетические механизмы дисфункции лимфоцитов крови при хронической вирусной инфекции // «Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии», г. Санкт-Петербург, 8-10 июня 2004 г. – СПб., 2004. - С. 204

– 205 (в соавт. с Наследниковой И.О., Рязанцевой Н.В., Новицким В.В., Мельниковой А.П., Степовой Е.А., Байковым А.Н.).

22. Изменение апоптотического потенциала лимфоцитов крови при хронических гепатитах В и С // IV съезд Научного общества гастроэнтерологов России, г. Москва, 11-12 февраля 2004 г. – Москва, 2004. – С. 20 (в соавт. с Чечиной О.Е., Рязанцевой Н.В., Новицким В.В., Михеевым С.Л., Наследниковой И.О., Антошиной М.А., Хлаповым А.П., Литваком М.М.).

23. Роль программируемой гибели лимфоцитов крови в патогенезе хронических HBV- и HCV-инфекций // Международная конференция «Развитие международного сотрудничества в области изучения инфекционных заболеваний», Новосибирск, Россия, 8-10 сентября 2004 г. – Новосибирск, 2004. – С. 56 (в соавт. с Рязанцевой Н.В., Новицким В.В., Радзивил Т.Т., Мельниковой А.П., Чечиной О.Е., Белобородовой Е.В., Михеевым С.Л., Литваком М.М., Наследниковой И.О., Ковалевой Н.П., Кулагиной И.В.).

24. Нарушения реализации апоптоза иммунокомпетентных клеток крови при хроническом гепатите С // I Международная конференция «Молекулярная медицина и биобезопасность», г. Москва, 26-28 октября 2004 г. – Москва, 2004. – С. 79-80 (в соавт. с Рязанцевой Н.В., Новицким В.В., Чечиной О.Е., Ермолаевой Е.С., Белобородовой Е.В., Радзивил Т.Т., Литваком М.М., Михеевым С.Л., Зима А.П.).

25. Апоптотическая гибель CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов при длительной персистенции вируса гепатита С // Материалы Межгородской конференции «Актуальные проблемы патофизиологии», г. Санкт-Петербург, 21-22 апреля 2005 г. – СПб, 2005. – С. 85 (в соавт. с Чечиной О.Е., Рязанцевой Н.В., Новицким В.В., Радзивил Т.Т., Белобородовой Е.В., Литваком М.М., Михеевым С.Л., Зима А.П.).

26. Реализация апоптоза лимфоцитов крови при персистенции вируса гепатита С // 6-я Всероссийская научно-практическая конференция «Вирусные гепатиты – проблемы эпидемиологии, диагностики, лечения и профилактики», г. Москва, 24-25 мая 2005 г. – Москва, 2005. – С. 178-179 (в соавт. с Литваком М.М., Рязанцевой Н.В., Новицким В.В., Чечиной О.Е., Радзивил Т.Т., Белобородовой Е.В., Михеевым С.Л., Зима А.П.).

27. Оценка экспрессии белков-регуляторов апоптоза в биоптатах печени больных хроническими вирусными гепатитами // Там же. – С. 210-212 (в соавт. с Михеевым С.Л., Рязанцевой Н.В., Новицким В.В., Белобородовой Е.В., Малковой Е.М., Литваком М.М., Чечиной О.Е., Мороз Е.А., Бутаковым А.А., Елмановой И.В.).

28. Фактор некроза опухоли альфа при хронических вирусных гепатитах. // Там же. - С. 297-298 (в соавт. с Рязанцевой Н.В., Новицким В.В., Зима А.П., Авдошиной В.В., Миноченко Ю.В., Пигузовой Е.А., Чечиной О.Е., Белобородовой Е.В., Козыревой В.С., Килиной О.В.).

29. Роль митохондриально-опосредованного пути апоптоза лимфоцитов крови в механизмах реализации противовирусного иммунитета // Тезисы докладов V Сибирского физиологического съезда, Томск, 29, 30 июня–1 июля 2005 г. – Бюллетень сибирской медицины. – 2005. – Т.4, Приложение 1. – С. 115



(в соавт. с Литваком М.М., Рязанцевой Н.В., Новицким В.В., Чечиной О.Е., Михеевым С.Л., Зима А.П., Литвиновой Л.С., Радзивил Т.Т., Пигузовой Е.А.).

30. Роль изменения экспрессии цитокинов и их рецепторов мононуклеарными лейкоцитами в условиях формирования противовирусного иммунитета // Там же. - С. 95 (в соавт. с Миноченко Ю.В., Зима А.П., Рязанцевой Н.В., Новицким В.В., Чечиной О.Е., Килиной О.В., Козыревой В.С., Пигузовой Е.А., Насыровой Р.Ф., Литвиновой Л.С., Колобовниковой Ю.В.).

31. Модуляция апоптоза лимфоцитов крови как способ выживания вируса гепатита С // Иммунология. – 2005. – Т.26, №2. – С. 79-83 (в соавт. с Рязанцевой Н.В., Новицким В.В., Никоновой М.Ф., Радзивил Т.Т., Чечиной О.Е.).

32. Вирусиндуцированная дизрегуляция программируемой клеточной гибели иммунокомпетентных клеток: адаптация или патология? // Успехи физиологических наук. – 2005. – Т. 36, №3. – С. 33-44 (в соавт. с Рязанцевой Н.В., Новицким В.В., Литваком М.М., Михеевым С.Л., Чечиной О.Е.).

33. Разработка технологии прогнозирования течения и исходов вирусных инфекций на основе идентификации молекулярных мишеней повреждения ключевых систем гомеостаза человека // Материалы II Международной конференции «Молекулярная медицина и биобезопасность», г. Москва, 20-21 октября 2005 г. – Москва, 2005. – С.132-133 (в соавт. с Рязанцевой Н.В., Зима А.П., Новицким В.В., Радзивил Т.Т., Литваком М.М., Михеевым С.Л., Чечиной О.Е., Мороз Е.А., Литвиновой Л.С., Колобовниковой Ю.В.).

34. Вирусиндуцированная модуляция программы апоптотической гибели клетки // Бюллетень сибирской медицины. – 2005. – № 4. – С. 78-83 (в соавт. с Чечиной О.Е., Рязанцевой Н.В., Новицким В.В., Михеевым С.Л., Литваком М.М.).

35. Лимфоциты при хроническом вирусном гепатите С: поверхностная архитектура, микровязкость мембраны и функциональная активность // Бюллетень СО РАМН. – 2005. – Т. 117, №3. – С. 78-82 (в соавт. с Новицким В.В., Наследниковой И.О., Рязанцевой Н.В., Токаревой Н.В., Белобородовой Э.И., Дунаевой Л.Е., Белобородовой Е.В., Антошиной М.А., Белоконь В.В.).

36. Роль нарушения продукции фактора некроза опухоли альфа мононуклеарами крови в механизмах модуляции апоптоза при гепатите С // Медицинская иммунология. – 2005. – Т. 7, №4. – С. 417-420 (в соавт. с Новицким В.В., Рязанцевой Н.В., Радзивил Т.Т., Белобородовой Е.В., Зима А.П., Наследниковой И.О., Литваком М.М., Михеевым С.Л.).

37. Дизрегуляция клеточного звена иммунитета при хроническом вирусном гепатите // Бюллетень СО РАМН. – 2005 – Т. 118, №4. – С 59-63 (в соавт. с Наследниковой И.О., Рязанцевой Н.В., Белобородовой Е.В., Новицким В.В., Белобородовой Э.И., Зима А.П., Антошиной М.А., Белоконь В.В.).

38. Dysregulation changes in the apoptosis of the lymphocytes in chronic virus infections // Innovation from biomolecules to biosystems, China, Shanghai, 1-4 September, 2005. – P. 47-48 (в соавт. с Novitskii V.V., Ryazantseva N.V., Mikheev S.L., Chechina O.E., Litvak M.M., Zima A.P.).

39. Изменение межклеточной кооперации мононуклеарных лейкоцитов в механизмах формирования персистентных вирусных инфекций // Материалы

Всероссийского научного симпозиума «Цитокины. Стволовая клетка. Иммуни-тет», г. Новосибирск, 19-21 июля 2005 г. – Цитокины и воспаление. - 2005. – Т.4, №2. - С. 97-98 (в соавт. с Рязанцевой Н.В., Новицким В.В., Зима А.П., Жуковой Н.Г., Наследниковой И.О., Миноченко Ю.В., Пигузовой Е.А.).

40. Механизмы межклеточной кооперации иммунокомпетентных клеток крови при хронической персистенции вируса клещевого энцефалита // Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием к 100-летию со дня рождения А.Г. Панова «Современное состояние проблемы нейроинфекций», г. Санкт-Петербург, 19-22 мая 2005 г. – Нейроиммунология. - 2005. – Т.3, №2. – С. 17 (в соавт. с Рязанцевой Н.В., Новицким В.В., Зима А.П., Жуковой Н.Г., Наследниковой И.О.).

41. Дизрегуляторные изменения апоптоза лимфоцитов при хронических вирусных инфекциях // Материалы Международного конгресса «Иммуни-тет и болезни: от теории к терапии», г. Москва, 3-8 октября 2005 г. – Журнал Ассоциация Детских Аллергологов и Иммунологов России. - 2005. –Т. 6, №5 (Прил. 1). – С. 198-199 (в соавт. с Новицким В.В., Рязанцевой Н.В.).

42. Роль нарушения регуляции апоптотической гибели в механизмах развития вирусиндуцированной цитогенетической нестабильности лимфоцитов крови // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2006 г. – Т. 141, №5. – С. 544-547 (в соавт. с Рязанцевой Н.В., Новицким В.В., Радзивил Т.Т., Михеевым С.Л., Чечиной О.Е., Зима А.П., Шиловым Б.В.).

43. Молекулярные и клеточные основы патогенеза клещевого энцефалита // Бюллетень сибирской медицины. – 2006. – Т. 5, Приложение 1. – С. 42-51 (в соавт. с Насыровой Р.Ф., Рязанцевой Н.В., Жуковой Н.Г., Зима А.П., Чечиной О.Е., Лепехиным А.В., Часовских Н.Ю., Новицким В.В.).

44. Закономерности нарушений межклеточной кооперации иммунокомпетентных клеток при антигенемии вируса клещевого энцефалита // Тезисы докладов Всероссийской научно-практической конференции «Современная ситуация и перспективы борьбы с клещевыми инфекциями в XXI веке», г. Томск, 14-15 февраля 2006 г. – Томск, 2006. – С. 48-49 (в соавт. с Зима А.П., Насыровой Р.Ф., Жуковой Н.Г., Чечиной О.Е., Чернышевой Н.П., Рязанцевой Н.В.).

45. Направленность клеточной дифференцировки в условиях хронического носительства вируса клещевого энцефалита // Там же – С. 96-97 (в соавт. с Насыровой Р.Ф., Жуковой Н.Г., Зима А.П., Чечиной О.Е., Рязанцевой Н.В.).

46. Особенности апоптотической реакции лимфоцитарных клеток у пациентов с персистенцией вируса клещевого энцефалита // Там же – С. 147-148 (в соавт. с Чечиной О.Е., Насыровой Р.Ф., Мороз Е.А., Рязанцевой Н.В., Жуковой Н.Г.).

47. Состояние системы эксцизионной репарации ДНК лимфоцитов при персистенции вируса клещевого энцефалита // Там же – С. 47-48 (в соавт. с Насыровой Р.Ф., Рязанцевой Н.В., Чечиной О.Е., Жуковой Н.Г., Новицким В.В.).

48. Молекулярные основы дизрегуляции программированной гибели лимфоцитов при хронической вирусной инфекции // Бюллетень сибирской ме-

дицины. – 2006. – Т. 5, №2. – С. 22-29 (в соавт. с Новицким В.В., Рязанцевой Н.В.).

49. Mitochondrial way of apoptosis in peripheral blood lymphocytes of patients with chronic viral hepatitis // 4th Conference Cytokines and Inflammation. – USA, California, La Jolla, January 30-31, 2006. – P. 235 (в соавт. с Litvak M.M., Mikheev S.L., Ryazantseva N.V., Novitskiy V.V., Moroz E.A.).

50. Иммунопатогенетические особенности клещевого энцефалита // Вопросы вирусологии. – 2006. – №6.- С. 28-34 (в соавт. с Рязанцевой Н.В., Новицким В.В., Зима А.П., Жуковой Н.Г., Наследниковой И.О., Лепехиным А.В., Миновичко Ю.В., Насыровой Р.Ф., Литваком М.М., Пигузовой Е.А., Килиной О.В.).

51. Цитокины и противовирусный иммунитет // Успехи физиологических наук. – 2006. – Т. 37, №4. – С. 1-11 (в соавт. с Рязанцевой Н.В., Новицким В.В., Белоконь В.В., Зима А.П., Наследниковой И.О., Белобородовой Е.В., Литвиновой Л.С., Колобовниковой Ю.В.).

52. Молекулярные механизмы нарушения апоптоза лимфоцитов при хронической вирусной инфекции // Бюллетень сибирской медицины. – 2006. - Т. 5, №3. – С. 19-25.

53. TNF-mediated apoptosis of peripheral blood lymphocytes in chronic hepatitis C // 4th Conference Cytokines and Inflammation. – USA, California, La Jolla, January 30-31, 2006. – P. 236 (в соавт. с Ryazantseva N.V., Novitskiy V.V., Zima A.P., Mikheev S.L., Piguzova E.A.).

54. Состояние митохондриального пути апоптоза лимфоцитов крови при хронических вирусных гепатитах // 5-я научно-практическая конференция с международным участием «Достижения фундаментальных наук в решении актуальных проблем медицины», г. Астрахань, 5-10 мая 2006 г. – Астрахань, 2006. – С. 126 (в соавт. с Михеевым С.Л., Рязанцевой Н.В., Новицким В.В., Мороз Е.А., Радзивил Т.Т., Крат И.В., Божковой И.В., Часовских Н.Ю.).

55. TNF-опосредованный апоптоз лимфоцитов крови при хроническом гепатите С // VIII конгресс с международным участием «Паллиативная медицина и реабилитация в здравоохранении», г. Москва, 2006 г. – Паллиативная медицина и реабилитация. – 2006. – №2. – С. 13 (в соавт. с Рязанцевой Н.В., Новицким В.В., Зима А.П., Михеевым С.Л., Пигузовой Е.А.).

56. Модуляция апоптоза лимфоцитов пациентов с вирусной персистенцией *in vitro* // Межгородская конференция «Актуальные проблемы патофизиологии», г. Санкт-Петербург, 20-21 апреля 2006 г. – СПб., 2006. – С. 97 (в соавт. с Мороз Е.А., Божковой И.В., Кайгородовой Е.В., Стариковой Е.Г.).

57. Фундаментальные механизмы нарушения апоптоза при хроническом вирусном гепатите // 6-я Восточно-сибирская гастроэнтерологическая конференция с международным участием «Клинико-эпидемиологические и этноэкологические проблемы заболеваний органов пищеварения», г. Красноярск, 4-5 мая 2006 г. – Красноярск, 2006. – С. 372-373 (в соавт. с Рязанцевой Н.В., Новицким В.В.).

58. Механизмы изменения продукции фактора некроза опухоли альфа при персистенции вируса клещевого энцефалита // Съезд неврологов Сибирского

федерального округа, г. Ярославль, 30-31 мая 2006 г. – Ярославль, 2006. – С. 108-109 (в соавт. с Зима А.П., Рязанцевой Н.В., Жуковой Н.Г., Пигузовой Е.А.).

59. Молекулярно-клеточные основы патогенеза хронических вирусных гепатитов // Российский медицинский форум с международным участием «Фундаментальная наука и практика», г. Москва, 18-20 октября 2006 г. – Москва, 2006. – С. 52 (в соавт. с Рязанцевой Н.В., Зима А.П., Новицким В.В., Наследниковой И.О., Литвиновой Л.С., Часовских Н.Ю.).

60. Апоптоз и вирусная инфекция. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 2006. – 142 с. (в соавт. с Рязанцевой Н.В., Новицким В.В.).

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИФА – иммуноферментный анализ

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

ФГА – фитогемагглютинин

FITC – флюоресцеинизотиоцианат

CD – кластер дифференцировки

HBV – вирус гепатита В

HCV – вирус гепатита С

HIV – вирус иммунодефицита человека

HSV – вирус простого герпеса

IFN – интерферон

Ig – иммуноглобулин

IL – интерлейкин

NK – натуральный киллер

NS – неструктурный белок

sTNF-RI – растворимая форма рецептора фактора некроза опухоли

TBEV – вирус клещевого энцефалита

Th – Т-хелпер-лимфоцит

TNF – фактор некроза опухоли

TNF-RI – рецептор фактора некроза опухоли

$\Delta\psi_m$  – трансмембранный потенциал митохондрии

Автор выражает глубокую признательность заведующему отделом клеточной иммунологии ГНЦ НИИ иммунологии Росздрава д-ру мед. наук, профессору А.А. Ярилину, заведующему кафедрой инфекционных болезней ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава д-ру мед. наук, профессору А.В. Лепехину, заведующей кафедрой терапии ФПК и ППС ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава д-ру мед. наук, профессору Э.И. Белобородовой, профессору кафедры неврологии и нейрохирургии ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава д-ру мед. наук Н.Г. Жуковой, с.н.с. ГНЦ НИИ иммунологии Росздрава канд. биол. наук М.Ф. Никоновой, доценту кафедры госпитальной терапии ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава канд. мед. наук Е.В. Белобородовой, заведующей лабораторией клинической иммунологии ГУЗ ЦМСЧ №81 ЗАТО Северск канд. мед. наук Т.Т. Радзивил, с.н.с. ЦНИЛ ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава канд. мед. наук Н.М. Шевцовой за проявленный интерес к работе, ценные теоретические и методические советы.