На правах рукописи

ТОКАРЕВА
Наталья Валентиновна

ИЗМЕНЕНИЯ СТРУКТУРЫ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН ЛИМФОЦИТОВ И ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ПЕРСИСТЕНТНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЯХ

14.00.16 – патологическая физиология

03.00.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Томск-2004

Работа выполнена в ГОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, ГУ НИИ биохимии СО РАМН

Научные руководители:

доктор медицинских наук **Рязанцева Наталья Владимировна**

доктор медицинских наук, профессор, академик РАМН **Панин Лев Евгеньевич**

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор, академик РАМН **Дыгай Александр Михайлович**

доктор медицинских наук, профессор **Канская Наталья Викторовна**

Ведущая организация:

ГОУ ВПО Красноярская государственная медицинская академия Минздрава России

Защита состоится «9» декабря 2004 г. в 12^{00} часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при Сибирском государственном медицинском университете (634050, Томск, ул. Московский тракт, 2)

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

Автореферат разослан «___»_____2004 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета **Суханова Г.А.**

Актуальность исследования. В последние десятилетия вирусные инфекции приобрели характер серьезной медико-социальной проблемы вследствие их широкого распространения и крайне неблагоприятного влияния на уровень здоровья и воспроизводства населения [Злобин В.И., 2000; Антонов П.В., 2001].

При рассмотрении патогенетических основ возникновения и развития вирусных инфекций в последние годы привлекает своей актуальностью явление длительной персистенции вирусов. Вирусная персистенция играет важную роль в распространении вирусной инфекции, поскольку вирусы могут передаваться при переливании крови и ее препаратов, медицинских манипуляциях, половых контактах [Маянский А.Н., 1998; Кузьмин Г.В. и соавт., 2000].

Несмотря на субклиническое, инапарантное течение ряда вирусных инфекций, в основе механизмов формирования вирусоносительства лежит репликация вируса со сборкой и размножением вириона или, по крайней мере, синтез отдельных вирусных компонентов в тканях инфицированного организма, что во многом обусловлено интеграцией вируса в клеточный геном. Кроме того, исследованиями последних лет удалось показать, что длительное развитие и становление хронической вирусной инфекции, а также "бессимптомное" вирусоносительство сопровождается постепенным изменением генотипа возбудителя, накоплением стабильных мутантных форм вирусов [Uchida T. et. al., 1994; Valliammai T. et. al., 1995; Тотолян А.А., 1999; Хаитов Р.М., 2000]. С другой стороны, при рассмотрении патогенеза вирусоносительства нельзя пренебрегать позицией взаимной «адаптации» в системе «вирус-макроорганизм», не исключающей биологическую целесообразность длительного сохранения вируса в организме [Антонов Т.В., 1999; Holub M., 2002] .

В изучении патогенеза вирусных инфекций особое место занимает проблема взаимодействия вируса с "клеткой-хозяином" [Исаева М.П. и соавт., 1998; Маянский А.Н., 1999; Ройт А., 2000, Хаитов Р.М., 2000]. Точное знание молекулярных механизмов взаимодействия вирусов с чувствительными клетками, которые вследствие цитопатического действия вируса часто гибнут, может позволить найти новые подходы к созданию антивирусных средств, блокирующих репликацию вирусов на ранних этапах их проникновения в клетку [Букринская А.Г., 1991; Протопопова Е.В. и соавт., 1998; Покровский В.И., 2000].

Патология, обусловленная длительной персистенцией вирусов, чрезвычайно разнообразна, характеризуется широким спектром функциональных изменений не только клеток, тропных к действию вирусов, но и клеточных сис-

тем, которые не явились непосредственной мишенью действия патогена [Маянский А.Н., 2000; Крыжановский Г.Н., 2001].

Среди структурно-функциональных систем клетки важную роль играет плазматическая мембрана, обеспечивающая барьер клетки, ионный транспорт, электрическую возбудимость, межклеточную коммуникацию, внутриклеточную передачу информации. Нарушение любого из этих свойств клетки может приводить к изменению ее жизнедеятельности или даже гибели [Болдырев А.А., 1990; Watala C., 1995; Геннис Р., 1997; Горошинская И.А. и соавт., 2000]. В частности, участие иммунокомпетентных клеток в процессах распознавания возбудителя и формирования иммунного ответа определяется метаболизмом клетки, структурными и функциональными свойствами плазматической мембраны [Булыгин Г.В. и соавт., 1992; Хаитов Р.М., 2000; Takakuwa Y., 2001]. В связи с этим при рассмотрении патогенетических основ формирования персистенции вирусной инфекции вполне закономерен интерес исследователей к выявлению структурно-функциональных особенностей плазматических мембран, оценке мембранодестабилизирующих процессов [Львов Д.К. и соавт., 2000; Новицкий В.В. и соавт., 2000; Sok M., 2002].

Изучение особенностей структуры, метаболизма и функционального состояния клеточных мембран клеток крови, играющих важную роль в обеспечении гомеостаза, при хронических вирусных инфекциях, несомненно, расширит имеющиеся представления о патогенезе этого состояния и, возможно, послужит основой для разработки эффективных методов диагностики и коррекции системных нарушений при данной патологии [Svetina S., 2001; Фаллер Д.М., 2003].

В связи с вышесказанным ***целью*** предпринятого исследования явилось выявление общих закономерностей и особенностей изменения структуры плазматической мембраны лимфоцитов и эритроцитов при длительной персистенции вирусов гепатита В и С, клещевого энцефалита.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие ***задачи*:**

1. Дать комплексную характеристику структурного состояния плазматической мембраны лимфоцитов и эритроцитов при длительной персистенции вирусов гепатита В и С, клещевого энцефалита.
2. Выявить особенности структурной организации плазматической мембраны лимфоцитов и эритроцитов у больных клещевым энцефалитом и хроническим вирусным гепатитом в зависимости от вида возбудителя, длительности и активности патологического процесса.

3. Выявить общие закономерности и особенности структурных изменений клеточных мембран лимфоцитов и эритроцитов при длительной персистенции вирусов гепатита В и С, клещевого энцефалита.
4. Оценить роль влияния дифенсиновых белков в механизмах модификации плазматических мембран лимфоцитов и эритроцитов при инфекционном процессе.

Положения, выносимые на защиту

1. При длительной персистенции вирусов гепатита В и С, клещевого энцефалита имеет место модификация структуры плазматических мембран клеток лимфоидной (лимфоциты) и нелимфоидной (эритроциты) природы.
2. Изменения структурных особенностей лимфоцитарных и эритроцитарных мембран при персистентных вирусных инфекциях (вирусный гепатит В и С, клещевой энцефалит) являются неспецифическими и носят однонаправленный характер. Выраженность изменений структуры плазматических мембран лимфоцитов и эритроцитов при персистентных вирусных инфекциях не зависит от таксономической принадлежности возбудителя, длительности и активности патологического процесса.
3. Механизмы нарушений структуры плазматических мембран клеток крови при вирусных инфекциях сопряжены с мембраномодифицирующим действием дифенсиновых белков (на модели аполипопротеина А-I).

Научная новизна. Впервые проведено сравнительное исследование структуры плазматических мембран лимфоцитов и эритроцитов при хронических персистентных вирусных инфекциях (вирусы гепатита В и С, клещевого энцефалита). Показано, что изменения структурной организации плазматических мембран клеток крови (лимфоциты, эритроциты) при хронической персистенции вирусов гепатита В и С, клещевого энцефалита однотипны и носят неспецифический характер. Впервые выявлено, что характер изменений структуры плазматических мембран клеток крови (лимфоциты, эритроциты) при персистенции вирусов гепатита В и С, клещевого энцефалита не зависит от таксономической принадлежности вирусов, длительности и активности патологического процесса. Впервые рассмотрен вопрос о роли дифенсиновых белков (на модели аполипопротеина А-I) в механизмах модификации плазматических мембран при вирусной инфекции.

Теоретическая и практическая значимость. В результате исследования получены новые данные фундаментального характера о состоянии плазматических мембран лимфоцитов и эритроцитов при длительной персистенции вирусов гепатита В и С, клещевого энцефалита. Выявленные однотипные измене-

ния структуры плазматических мембран клеток лимфоидной (лимфоциты) и нелимфоидной (эритроциты) природы при длительной вирусной персистенции являются фактическим подтверждением генерализованного характера повреждения и неспецифичности модификации плазматических мембран разных клеточных систем.

Полученные по итогам работы данные фундаментального характера могут быть использованы для разработки целенаправленной патогенетически обоснованной мембранотропной методологии коррекции системных нарушений при хронических вирусных инфекциях.

Реализация и апробация работы. Результаты исследования используются в курсе лекций по патологической физиологии (раздел «Патофизиология клетки», «Патофизиология инфекционного процесса», «Патофизиология иммунной системы») на лечебном и педиатрическом факультетах Сибирского государственного медицинского университета.

Результаты исследования доложены и обсуждены на Пироговской научной конференции (г. Москва, 2003), Межрегиональной научной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения академика АМН СССР С.П. Карпова (г. Томск, 2003), VI Российском съезде «Врачей инфекционистов» (г. Санкт-Петербург, 2003), Второй международной конференции «Патофизиология и современная медицина» (г. Москва, 2004), Межгородской конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии» (г. Санкт-Петербург, 2004).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 16 работ, 9 из них размещены в центральных рецензируемых журналах.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 160 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, выводов и списка литературы, включающего 320 источников, из которых 208 отечественных и 112 иностранных. Диссертация иллюстрирована 25 таблицами, 2 рисунками.

Характеристика клинического материала и методы исследования

В основу настоящей работы положены результаты комплексного клинико-лабораторного исследования структурно-функционального статуса мембраны эритроцитов и особенностей структурной организации лимфоцитарной мембраны у 173 пациентов (100 мужчин, 73 женщины в возрасте от 18 до 50 лет, средний возраст - 30±3 лет) с персистенцией вирусов клещевого энцефали-

та, гепатитов В и С, проводившегося на базе инфекционных отделений клиник ГОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России», медико-санитарной части «Строитель», городской больницы № 3 г. Томска и отделения гастроэнтерологии Томской областной клинической больницы. Набор клинического материала проводился под руководством зав. кафедрой инфекционных болезней СибГМУ МЗ РФ д.м.н., профессора А.В. Лепехина и зав. кафедрой терапии ФПК и ППС д.м.н., профессора Э.И. Белобородовой, за что автор приносит им свою глубокую признательность.

Клинически и анамнестически у всех обследованных лиц были исключены инфекционные заболевания другой этиологии, обострение хронических воспалительных процессов, наследственные и психические болезни, а также злоупотребление алкоголем и наркотическими средствами.

Контрольную группу составили 40 практически здоровых доноров с аналогичными характеристиками по полу и возрасту.

Первую группу обследованных составили 68 пациентов с длительной персистенцией антигена вируса клещевого энцефалита (более 6 мес с момента инфицирования). Верификацию диагноза вируса клещевого энцефалита проводили на основании данных эпидемиологического анамнеза (факт присасывания клеща, пребывание в эпидемическом очаге и др.), результатов лабораторного исследования (определение уровня специфических антител к антигену вируса клещевого энцефалита с помощью иммуноферментного анализа, реакции непрямой гемагглютинации, обнаружение вирусной РНК методом полимеразной цепной реакции), а также оценки неврологического статуса.

Были выделены 2 группы обследованных: пациенты с хроническим носительством вируса клещевого энцефалита без клинических проявлений нейроинфекции (39 человек) и пациенты с хроническим носительством вируса клещевого энцефалита с минимальными клиническими проявлениями заболевания (29 человек). Клиническая картина нейроинфекции у таких больных включала цереброгенную астению (снижение работоспособности, утренние головные боли, повышенная утомляемость, снижение памяти) и остаточную неврологическую симптоматику (анизорефлексия, мигрирующая невралгия, миалгия, локальное снижение болевой чувствительности). Из вегетативных расстройств обращали на себя внимание лабильность артериального давления, неустойчивость настроения, гипергидроз, стойкий красный дермографизм, нарушение сна.

Диагноз хронического вирусного гепатита устанавливался в соответствии с классификацией, принятой Всемирным конгрессом гастроэнтерологов в Лос-

Анджелесе [1994], и основывался на наличии клинико-инструментальных симптомов (гепато-, спленомегалия) и клинико-лабораторных синдромов (холестаза, цитолиза, мезенхимально-воспалительного синдрома). Этиологическая верификация диагноза проводилась на основании выявления в сыворотке крови ДНК HBV, РНК HCV (молекулярно-генетическим методом ПЦР), серологических маркеров HBV (HbeAg, HBsAg, анти-HBc IgM, анти-Hbcor) и HCV (анти-HCV IgG к core, С - протеину, неструктурным белкам (NS3, NS4, NS5, анти-HCV IgM). По выраженности некроза паренхимы и воспалительной клеточной инфильтрации (некротически-воспалительная активность) в биоптатах печени определяли степень активности хронического гепатита, оценивая выраженность гистологических признаков в баллах в соответствии с «Индексом гистологической активности» по R.J. Knodell и соавт. [1981].

Среди обследованных с персистенцией вирусов гепатита В и С у 11 больных определялся хронический гепатит В умеренной степени активности, у 23 – хронический гепатит С умеренной степени активности, у 11 – хронический гепатит В+С умеренной степени активности; 28 больным был поставлен диагноз – хронический гепатит В слабовыраженной степени активности, 25 – хронический гепатит С слабовыраженной степени активности, 7 – хронический гепатит В+С слабовыраженной степени активности (табл. 1).

Материалом исследования являлась венозная кровь обследованных лиц, взятая утром натощак. Кровь стабилизировали гепарином (25 Ед/мл).

Мембраны эритроцитов выделяли методом, предложенным J. T. Dodge et. al. [1963]. Микробиуретовым методом определяли содержание белка в мембране.

Определение спектральных характеристик взаимодействия мембраны эритроцитов с флуорофорами проводили на спектрофлуориметре «Hitachi-MPF-4» (Япония). Выбор флуоресцентных зондов осуществлялся, исходя из возможности одновременного сканирования глубинных и поверхностных слоев мембраны. В качестве флуорофоров были выбраны следующие соединения: пирен, 1-анилинонафталин-8-сульфонат (АНС), фенил-1-нафтиламин (ФНА) («Sigma», США) [Владимиров Ю. А., 1980].

Для оценки микровязкостных свойств липидной фазы мембраны эритроцитов рассчитывали коэффициенты эксимеризации пирена (I_{470}/I_{370} и I_{470}/I_{390}), равные отношению максимумов интенсивностей флуоресценции эксимерной формы зонда к мономерной при длинах волн возбуждающего света 285 и 340 нм. Процент индуктивно-резонансного переноса энергии с триптофана на пирен, позволяющий судить о белково-липидных взаимодействиях в

Таблица 1

Распределение здоровых доноров и больных с персистенцией вирусов гепатита и клещевого энцефалита в соответствии с использованными методами исследования плазматических мембран эритроцитов и лимфоцитов

№	Методы исследования	Группы обследованных								
		Здоровые доноры	Пациенты с хроническим вирусным гепатитом						Пациенты с длительной персистенцией вируса энцефалита	
			слабовыраженной степени активности			умеренной степени активности			без клинических проявлений нейроинфекции	с клиническими проявлениями нейроинфекции
			В	С	В+С	В	С	В+С		
1	Флуоресцентное зондирование мембраны эритроцитов зондом пирен	40	22	17	7	11	21	10	16	25
2	Флуоресцентное зондирование мембраны эритроцитов зондом фенилнафтиламин	23	19	15	7	7	16	7	16	21
3	Флуоресцентное зондирование мембраны эритроцитов зондом анилинонафталин-8-сульфонат	23	19	15	7	7	7	7	16	21
4	Определение активности Na^+,K^+-АТФазы в мембране эритроцитов	31	22	15	7	9	20	9	14	25
5	Исследование структуры плазматической мембраны лимфоцитов с использованием флуоресцентного зонда пирен	39	22	17	7	11	21	10	16	25
7	Изучение содержания липидов в мембране эритроцитов	16	7	6	3	5	7	2	9	7
8	Изучение содержания липидов в плазматической мембране лимфоцитов	16	7	6	3	5	7	2	7	9

мембране, рассчитывали по формуле: $R=(1-I^*_{340}/I_{340})\cdot 100\%$, где I_{340} - интенсивность собственной флуоресценции мембраны эритроцитов при возбуждении светом с длиной волны 285 нм в отсутствии пирена, I^*_{340} - интенсивность собственной флуоресценции мембраны эритроцитов при возбуждении светом с длиной волны 285 нм при добавлении пирена. Результаты выражали в условных единицах.

Для расчета поляризации флуоресценции зонда ФНА использовали формулу: P=(F⊥ - F||)/(F⊥ + F||), где F⊥ и F||- интенсивности флуоресценции, измеряемые при прохождении света флуоресценции через поляроид, ориентированный параллельно и перпендикулярно направлению вектора поляризации возбуждающего света. Величину степени поляризации флуоресценции зонда ФНА выражали в условных единицах.

Для изучения структурных особенностей поверхностных слоев мембраны эритроцитов проводили флуоресцентное зондирование отрицательно заряженным зондом АНС. Определение константы связывания и числа мест связывания зонда АНС было рассчитано графическим методом двойных обратных координат. Полученные величины выражали в условных единицах.

Определение активности Na^+,K^+-АТФазы в мембране эритроцитов проводили методом, разработанным А. М. Казенновым и соавт. [1984]. Уровень Pi определяли по методу P. S. Chen et al. [1956].

Проводили исследование структуры плазматической мембраны лимфоцитов с помощью флуоресцентного зондирования зондом пирен [Добрецов Г. Е., 1989]. Для этого выделяли суспензию лимфоцитов по методу Дж. Б. Натвиг и соавт. [1980], подсчитывали их количество.

Липиды плазматических мембран эритроцитов и лимфоцитов экстрагировали хлороформ-метаноловой смесью по методу J. Folch et. al. [1957]. Определяли их абсолютное содержание по методу И.А. Тарановой [1987].

В рамках диссертационной работы был выполнен экспериментальный блок, связанный с исследованием структурной организации плазматических мембран клеток крови у больных с персистенцией вирусов гепатита и клещевого энцефалита, а также у здоровых доноров в условиях инкубации мембранной эритроцитарной взвеси и лимфоцитов с аполипопротеином А-I (апоА-I) in vitro (табл. 2).

Был использован метод выделения липопротеинов плазмы, основанный на различиях в размерах, плотности частиц и скорости флотации [Laemli U.K., 1970; Климов А.Н., 1999].

Экспериментальное исследование проводили в два этапа. Вначале регистрировали спектральные характеристики взаимодействия флуорофора пирен с интактной взвесью мембран эритроцитов и цельными лимфоцитарными клетками, полученными у здоровых лиц и больных с вирусными инфекциями, вычисляли указанные выше параметры, а также определяли активность Na^+,K^+-АТФазы. На втором этапе – проводили исследование структуры мембраны эритроцитов и лимфоцитов после их инкубации in vitro с аполипопротеином А-I.

Полученные в ходе исследования данные обрабатывали с использованием

Таблица 2

Распределение здоровых доноров и больных с персистенцией вирусов гепатита и клещевого энцефалита в соответствии с использованными экспериментальными методами исследования плазматических мембран эритроцитов и лимфоцитов при их инкубации с аполипопротеином А-I (apo A-I) in vitro

№	Методы исследования	Группы обследованных		
		Здоровые доноры	Пациенты с хроническим вирусным гепатитом	Пациенты с длительной персистенцией вируса клещевого энцефалита
6	Исследование структуры мембраны эритроцитов с использованием флуоресцентного зонда пирен при инкубации мембранной взвеси с апоА-I	16	22	16
7	Определение активности Na^+,K^+-АТФазы в мембране эритроцитов при инкубации мембранной взвеси с апо А-I	8	21	10
8	Исследование структуры мембраны лимфоцитов с использованием флуоресцентного зонда пирен при инкубации лимфоцитов с апо А-I	16	22	16

стандартного пакета программ «Statistica for Windows» (2000, версия 6.0) фирмы «Statsoft Inc.». Нормальность распределения количественных показателей была проверена с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Затем проверяли статистические гипотезы о равенстве средних значений и дисперсий для отдельных групп пациентов: гипотеза о равенстве средних проверялась с помощью t-критерия Стьюдента, гипотеза о равенстве дисперсий – с помощью отношения дисперсий Фишера. Для сравнения признаков, не отвечающих требованиям нормального распределения, использовали непараметрический тест Манна-Уитни (U-тест). Различия считались достоверными при уровне значимости $p<0,05$ [Лакин А.В., 1989].

Результаты исследования и их обсуждение

Клинический облик многих вирусных персистентных инфекций определяется длительным пребыванием возбудителя в организме, в основе которого лежит способность вирусов закрепляться в клеточных популяциях, используя для этого разнообразные приемы - от «замораживания» собственных генов в

хромосомах клетки-хозяина до агрессивного вмешательства в систему индукторов и эффекторов иммунитета [Жданов В.М., 1984; Букринская А.Г., 1991; Маянский А.Н., 1999; Хаитов Р.М., 2000].

Феномен персистенции вирусов затрагивает различные звенья иммунной системы. Известно, что цитопатические процессы при действии инфекционных возбудителей определяются не только свойствами самого инфекционного агента, но и непосредственным участием в этом процессе иммунокомпетентных клеток периферической крови [Ярилин А.А., 1999; Решетняк В.И., 2002; Фаллер Д.М., 2003].

В связи с этим в последние годы возрос интерес исследователей к вопросу о роли лимфоцитов в механизмах возникновения и развития инфекционного процесса, обусловленного длительной персистенцией вирусов в организме [Маянский А.Н. и соавт., 1998; Хаитов Р.М. соавт., 2000; Наследникова И.О., 2002; Уразова О.И., 2002].

Показано, что при инфицировании вирусными агентами лимфоцит не столько подвергается гибели, сколько утрачивает свою функциональную активность [Серов В.В., Апросина З.Г., 1995; Ющук Н.Л. и соавт., 2000; Серов В.В., 2001; Игнатова Т.М., 2001; Лакина Е.И., 2002; Фридлянд И.Ф. и соавт., 2002].

Очевидно, что судьба инфицированных иммунокомпетентных клеток во многом определяется структурным и функциональным состоянием плазматической мембраны. Лимфоциты несут на своей мембране множество разных рецепторов, взаимодействие с которыми является сигналом к активации [Уманский Ю.А., 1981; Игнатьева Г.А., 1997; Фрейдлин И.С., 1998; Тотолян А.А., 1999; Фрейдлин И.С., 1999; Хаитов Р.М., 2000].

Одной из важных причин первичных событий после связывания лиганда с рецептором является индуцированное им изменение физико-химического состояния липидной фазы мембраны, которое обеспечивает оптимальные условия для реализации последующих пострецепторных стадий трансмембранной передачи сигнала [Fujisawa T., 1997; Игнатьева Г.А., 1998; Сидорова И.С., 1998; Ивашкин В.Т., 2000; Хаитов Р.М., 2000; Собчак Д.М., 2004]. Известна модулирующая роль микровязкости мембраны в латеральной подвижности рецепторных молекул в плоскости мембраны, от которой зависит сближение рецепторных субъединиц [Comfurius P., 1992; Catania A., 1992; Wustner D. et al., 1998; Corver J., 2000].

Однако данные относительно характера структурной дезорганизации плазматической мембраны лимфоцитов при вирусных инфекциях носят весьма фрагментарный, несистематизированный характер и не позволяют однозначно

оценить направленность и динамику патологических сдвигов при инфекционном процессе.

В настоящее время неопровержимым считается тот факт, что нормальное функционирование плазматической мембраны зависит от ее микровязкостных свойств [Владимирова, 1980, Конев С.В., 1987; Болдырев, 1990, Gudi S.R.P., 1990; Celedon G., 1992; Catania A., 1992; Геннис Р., 1997; Dumas D., 1997; Wustner D. et al., 1998; Corver J., 2000; Kamp D., 2001]. Поддержание текучести мембраны на физиологическом оптимальном уровне необходимо для осуществления латеральной диффузии белковых и липидных молекул, трансмембранного флип-флоп-переноса липидов [Конев С.В., 1987; Catania A., 1992; Celedon G., 1992; Dumas D., 1997; Corver J., 2000].

В связи с этим в проведенном в нашей лаборатории исследовании основное внимание было сконцентрировано на оценке микровязкостных свойств плазматической мембраны лимфоцитов у больных с хроническим вирусным гепатитом и длительной персистенцией вируса клещевого энцефалита, проведенной с использованием флуоресцентного зондирования. В предпринятом нами исследовании микровязкостных свойств плазматической мембраны лимфоцитов использовали флуоресцентный зонд пирен - неполярный, липотропный, диффундирующий в углеводородной области мембраны [Владимиров Ю.А., 1980, Болдырев А.А., 1990; Dave B.J., 1993; Геннис Р., 1997].

В частности, проведенное нами исследование структуры плазматической мембраны лимфоцитов позволило установить, что у больных хроническим вирусным гепатитом имело место достоверное по сравнению с аналогичными показателями у здоровых доноров уменьшение параметров флуоресценции I_{470}/I_{370} и I_{470}/I_{390} при длине волны возбуждающего света 285 нм независимо от таксономической принадлежности возбудителя (В, С и микст- инфекция В+С) и активности патологического процесса (табл. 3). Отмеченное нами у больных хроническим вирусным гепатитом снижение указанных параметров свидетельствует о повышении микровязкости и/или снижении гидрофобного объема зоны белок-липидных контактов [Добрецов Г.Е., 1980, Дунаева А.Н., 1990]. Исследование спектральных характеристик взаимодействия липотропного зонда пирен с плазматической мембраной лимфоцитов у пациентов с длительной персистенцией вируса клещевого энцефалита без клинических проявлений и с клинической симптоматикой нейроинфекции выявило аналогичный характер изменений параметров флуоресценции зонда, что и при обследовании больных с хроническим вирусным гепатитом (табл. 3).

Повышение микровязкости липидной фазы плазматической мембраны лимфоцитов приводит к дисфункции мембраносвязанных ферментов, тормозит связывание рецепторов с вторичными мессенжерами и лигандами, выполнение иммунных функций. Предполагается, что именно повышение ригидности липидного бислоя мембраны лимфоцитов является одной из причин нарушения процессов распознавания вирусных агентов при инфекционном процессе [Dumas D., 1997; Wustner D. et al., 1998; Corver J., 2000; Kamp D., 2001].

Однако, как показало проведенное исследование, изменения микровязкостных свойств плазматической мембраны лимфоцитов при вирусных инфекциях не являются специфичными для иммунокомпетентных клеток. Аналогичные изменения структурных свойств плазматической мембраны были выявлены в нашей лаборатории при исследовании эритроцитарной мембраны, не являющейся мишенью для вирусов у больных с хроническим гепатитом и пациентов с длительным носительством вируса клещевого энцефалита.

Сегодня можно с убедительностью говорить о том, что такая высокоспециализированная клетка как эритроцит вовлекается в патологический процесс не только при гематологических заболеваниях, но и претерпевает серьезные изменения структуры и функции при болезнях разного генеза. Повышенный интерес исследователей к эритроциту при патологии обусловлен его участием в процессах, связанных с поддержанием гомеостаза на уровне целого организма. Эритроцитарной мембране присущи общие принципы молекулярной организации и функционирования плазматических мембран, позволяющие в определенной степени экстраполировать закономерности ее модификации на иные клеточные системы. Помимо этого, видимая простота организации эритроцита дает возможность изучать функциональные свойства плазматической мембраны без помех, накладываемых внутриклеточными мембранными образованиями [Постнов В.Ю., 1987].

Важным свойством эритроцитарной мембраны, определяемой, главным образом, состоянием ее липидной фазы, является текучесть [Марри Р., 1993; Muzulu S.I. et al., 1995; Геннис Р., 1997; Sein K.K., Aikawa M., 1998]. Учитывая важную роль микровязкостных свойств липидной компоненты эритроцитарной мембраны в регуляции функциональных свойств клеток, нами было проведено исследование структуры мембраны эритроцитов периферической крови у больных с хроническими вирусными инфекциями методом флуоресцентного зондирования.

Изучение структурных особенностей мембраны красных кровяных клеток неполярным зондом пирен, диффундирующим в гидрофобном компартменте

мембраны, позволило выявить у пациентов, страдающих хроническим вирусным гепатитом, отчетливое снижение коэффициентов эксимеризации пирена I_{470}/I_{370} и I_{470}/I_{390} при длинах волн возбуждающего света, равных 285 и 340 нм по сравнению с аналогичными показателями у здоровых лиц (табл. 4). Поскольку величина эксимеризации пирена обратно пропорциональна вязкости липидной фазы, обнаруженное нами достоверное снижение изученных показателей указывало на повышение упорядоченности молекул как интегрального липидного бислоя, оцениваемой при λ_B=340 нм, так и анулярной липидной фракции (при λ_B=285 нм). Возрастание микровязкости липидного бислоя мембраны эритроцитов у больных хроническим вирусным гепатитом было подтверждено в нашей лаборатории при проведении флуоресцентного зондирования эритроцитарной мембраны зондом ФНА (табл. 5). Наиболее часто местом локализации данного зонда в мембране являются области глицеринового скелета и карбонильных групп фосфолипидов [Добрецов Г.Е., 1989; McMinn P.C., 1997].

При исследовании структурных особенностей наружного отдела эритроцитарной мембраны посредством зонда АНС, локализующегося благодаря присутствию отрицательно заряженной сульфонильной группы в молекуле зонда на поверхности мембраны, было установлено, что мембрана эритроцитов у больных хроническим вирусным гепатитом имело в несколько раз больше центров сорбции АНС, чем эритроцитарная мембрана здоровых доноров, что прежде всего указывало на изменение характера заряда полярных головок фосфолипидов (табл. 5).

Следует отметить, что характер и степень разупорядоченности липидной фазы плазматической мембраны лимфоцитов периферической крови у больных хроническим вирусным гепатитом не зависели от длительности (до 5 лет, 5-10 лет, более 10 лет) патологического процесса.

В нашей лаборатории было проведено исследование структуры мембраны эритроцитов у пациентов с клещевым энцефалитом. Полученные с использованием флуоресцентных зондов пирен, ФНА и АНС фактические данные указывали на наличие у больных с длительной персистенцией вируса клещевого энцефалита изменений структуры эритроцитарной мембраны как при клинически выраженной форме инфекции, так и у пациентов с бессимптомным носительством антигена вируса клещевого энцефалита (табл. 4, 5).

Примечательно, что длительность носительства вируса клещевого энцефалита (до 1 года, 1-3 лет, более 3 лет) не явилась определяющим фактором в индуцированной структурной модификации плазматических мембран эритроцитов.

Таблица 3

Результаты флуоресцентного зондирования плазматической мембраны лимфоцитов флуорофором пирен у пациентов с персистенцией вирусов гепатита В и С, клещевого энцефалита ($\bar{X}\pm m$)

Группы обследованных	Параметры флуоресценции, усл. ед.		Величина миграции энергии с триптофана на пирен, R %
	I_{470}/I_{370}, λ_B=285 нм	I_{470}/I_{390}, λ_B=285 нм	
Здоровые доноры	1,373±0,019	1,400±0,012	59,48±3,05
Больные хроническим вирусным гепатитом В	1,145±0,011 p_1<0,001	1,327±0,013 p_1>0,05	50,11±2,70 p_1<0,01
Больные хроническим вирусным гепатитом С	1,143±0,011 p_1<0,001 p_2>0,05	1,213±0,015 p_1<0,01 p_2>0,05	48,18±2,45 p_1<0,001 p_2>0,05
Больные хроническим вирусным гепатитом В+С	1,112±0,011 p_1<0,001 p_2>0,05 p_3>0,05	1,157±0,017 p_1<0,001 p_2<0,05 p_3>0,05	34,05±1,63 p_1<0,001 p_2<0,001 p_3<0,001
Пациенты с хроническим носительством вируса клещевого энцефалита без клинических проявлений заболевания	1,124±0,018 p_1<0,001	1,131±0,017 p_1<0,001	37,36±2,49 p_1<0,001
Пациенты с хроническим носительством вируса клещевого энцефалита с клиническими проявлениями заболевания	1,206±0,016 p_1<0,001 p_4> 0,05	1,237±0,014 p_1<0,001 p_4> 0,05	39,75±1,99 p_1<0,001 p_4> 0,05

Примечание: здесь и в табл. 4, 5 p_1 – достоверность различий показателей по сравнению с их значениями у здоровых доноров; p_2 – достоверность различий по сравнению со значениями показателей у больных хроническим вирусным гепатитом В; p_3 – достоверность различий по сравнению со значениями показателей у больных хроническим вирусным гепатитом С; p_4 – достоверность различий показателей по сравнению с таковыми у больных хроническим носительством вируса клещевого энцефалита без клинических проявлений заболевания.

Важнейшими компонентами плазматической мембраны являются белки. Они обеспечивают транспорт молекул внутрь клетки и из нее, катализируют в качестве ферментов ассоциированные с мембранной реакции, служат в качестве рецепторов для получения и преобразования химических сигналов из окружающей среды, а также определяют морфологические и механические свойства клетки [Конев С.В., 1987; Сторожок С.А., Санников А.Г., 1996].

Как показало проведенное нами исследование, в мембране эритроцитов у больных хроническим вирусным гепатитом и у пациентов с длительным

Таблица 5

Результаты флуоресцентного зондирования мембраны эритроцитов флуорофорами фенил-1-нафтиламин (ФНА) и 1-анилинонафталин-8-сульфонат (АНС) у пациентов с персистенцией вирусов гепатита В и С, клещевого энцефалита ($\bar{X}\pm m$)

Группы обследованных	Степень поляризации флуоресценции ФНА, усл.ед.	Константа связывания АНС, усл.ед.	Число мест связывания АНС, усл.ед.
Здоровые доноры	0,158±0,017	0,257±0,013	0,808±0,020
Больные хроническим вирусным гепатитом В	0,180±0,014 $p_1>0,05$	0,239±0,023 $p_1>0,05$	1,133±0,013 $p_1<0,01$
Больные хроническим вирусным гепатитом С	0,232±0,017 $p_1<0,01$ $p_2<0,01$	0,193±0,026 $p_1<0,01$ $p_2<0,05$	1,028±0,017 $p_1<0,01$ $p_2<0,05$
Больные хроническим вирусным гепатитом В+С	0,208±0,026 $p_1<0,001$ $p_2>0,05$ $p_3> 0,05$	0,275±0,019 $p_1>0,05$ $p_2<0,05$ $p_3< 0,05$	0,881±0,018 $p_1>0,01$ $p_2<0,05$ $p_3< 0,05$
Пациенты с хроническим носительством вируса клещевого энцефалита без клинических проявлений заболевания	0,233±0,011 $p_1<0,001$	0,640±0,027 $p_1<0,001$	1,067±0,018 $p_1<0,05$
Пациенты с хроническим носительством вируса клещевого энцефалита с клиническими проявлениями заболевания	0,198±0,012 $p_1<0,05$ $p_4<0,05$	0,465±0,023 $p_1<0,001$ $p_4<0,01$	1,158±0,011 $p_1<0,01$ $p_4<0,05$

носительством антигена вируса клещевого энцефалита имело место отчетливое угнетение активности Na^+,K^+-АТФазы. Так, у больных хроническим вирусным гепатитом уровень активности Na^+,K^+-АТФазы в плазматической мембране красных кровяных клеток составил 0,031±0,009 мкмоль P_i/ час·мг белка, что было 2,6 раза ниже аналогичного показателя уздоровых лиц (0,082±0,008 мкмоль P_i/час·мг белка, $p<0,001$). У пациентов с хроническим носительством вируса клещевого энцефалита активность Na^+, K^+-АТФазы снижалась до 0,044±0,009 мкмоль P_i/ час·мг белка ($p<0,001$), что было в 1,8 раза ниже
аналогичного показателя у здоровых доноров. Не исключено, что ингибирование активности Na^+,K^+-АТФазы является результатом выявленной структурной

модификации липидного матрикса мембраны эритроцитов. Общепринятой является точка зрения о том, что регулирующая роль липид-белковых взаимодействий для Na^+,K^+-АТФазы сводится к обеспечению ее каталитических функции и переходов между различными конформационными состояниями посредством поддержания определенной микровязкости мембраны, а также за счет взаимодействия заряженных боковых цепей этих ферментов с полярными головками мембранных липидов [Грибанов Г.А., 1991; Foley T.D., 1994; Glaser T., 1994; McMinn P.C., 1997; Успенская Ю.А., 2002].

Таким образом, у больных хроническим вирусным гепатитом и пациентов с длительным носительством вируса клещевого энцефалита выявлялись отчетливые признаки возрастания микровязкости липидной фазы плазматических мембран лимфоцитов и эритроцитов, затрагивающие как область жирнокислотных цепей фосфолипидов, так и поверхностные слои мембран, увеличение микровязкости их липидного бислоя в целом, в том числе и в области липид-белковых контактов, а также ингибирование активности катион-транспортирующего энзима Na^+,K^+-АТФазы [Lin S., 1994; Mal'dov D.G, 1997].

Однако, вероятно, нельзя говорить о том, что отмеченные при хронической вирусной инфекции (в частности, гепатит В, С и микст инфекция В+С, клещевой энцефалит) молекулярные изменения мембраны эритроцитов и плазматической мембраны лимфоцитов являются сугубо специфическими для указанных инфекций. Впрочем, сам диапазон гипотетических молекулярных механизмов дизрегуляции плазматической мембраны весьма универсален (рис.).

Однако запуску типовых механизмов повреждения предшествуют специфические повреждающие процессы, которые запускаются под действием тех или иных этиологических факторов. Исходя из этих позиций, мы проследили гипотетически возможную цепь повреждающего действия плазматических мембран в условиях инфекционного процесса путем взаимодействия с белками, обладающими дифенсиновыми свойствами. Эти низкомолекулярные белки содержатся в цитоплазматических гранулах нейтрофилов. Под влиянием различных стимулов, в том числе, бактерий и вирусов, дифенсины попадают в кровь, где оказывают бактерицидное действие. Они содержат много цистеина и аргинина и относятся к группе катионных белков. Присутствие в молекуле большого количества полярных и неполярных участков придает им свойство поверхностно-активных соединений. Именно поэтому дифенсины взаимодействуют с биологическими мембранами, нарушая их структуру и функцию. Они повреждают бактерии и вирусы, разрушают опухолевые клетки и, конечно, оказывают влияние на плазматические мембраны клеток крови. К группе дифенсиновых

белков относят протамины, гистоны и многие аполипопротеины [Поляков Л.М., Панин Л.Е., 2000]. Для оценки системных изменений плазматических мембран клеток периферической крови под влиянием дифенсиновых белков нами был использован аполипопротеин А-I.

При спектрофлуориметрическом исследовании плазматических мембран доноров было выявлено, что при инкубации плазматических мембран с аполипопротеином А-I in vitro клеточные мембраны повреждались в большей степени у здоровых доноров, чем у обследованных больных.

Так, при исследовании спектральных характеристик взаимодействия липотропного зонда пирен с взвесью мембран эритроцитов, полученных у здоровых доноров, коэффициенты эксимеризации I_{470}/I_{370} и I_{470}/I_{390} до инкубации с аполипопротеином А-I составили 0,400±0,018 и 0,410±0,015 усл. ед. соответственно. Однако эти же показатели после инкубации мембранной взвеси с аполипопротеином А-I у здоровых доноров были статистически значимо снижены и составили 0,290±0,013 и 0,320±0,016 усл. ед. ($p<0,001$) соответственно. Процент индуктивно-резонансного переноса энергии с триптофана на пирен, позволяющий судить о белково-липидных взаимодействиях в мембране, до инкубации с аполипопротеином А-I составил 56,31±2,46 %, после инкубации - 44,12±2,86 % ($p<0,01$).

Изучение структурных особенностей плазматических мембран эритроцитов и лимфоцитов у больных хроническим вирусным гепатитом и пациентов с длительным носительством вируса клещевого энцефалита после инкубации in vitro с аполипопротеином А-I с исследование неполярного зонда пирен, позволило выявить изменения коэффициентов эксимеризации пирена I_{470}/I_{370} и I_{470}/I_{390} при длинах волн возбуждающего света 285 и 340 нм. Степень выраженности модификации плазматических мембран клеток была сопоставима с таковыми у обследованных больных без инкубации с аполипопротеином А-I.

Учитывая важную роль плазматической мембраны в поддержании внутриклеточного и внеклеточного гомеостаза, а также принимая во внимание лидирующую роль структурных перестроек мембраны в возникновении и развитии патологических процессов разного генеза, становится очевидным, что дальнейшее углубленное изучение особенностей структурно-метаболической и функциональной организации клеточных мембран целесообразно для расширения представлений о характере и механизмах патологических изменений при инфекционном процессе.

Выводы

1. При длительной вирусной персистенции (вирусы гепатита В и С, клещевого энцефалита) развиваются системные изменения плазматических мембран клеток как лимфоидной (лимфоциты), так и нелимфоидной природы (эритроциты).
2. Изменения структурной организации плазматических мембран эритроцитов и лимфоцитов при длительной персистенции вирусов клещевого энцефалита, гепатита В и С однотипны и носят неспецифический характер.
3. У больных хроническим вирусным гепатитом В и С в плазматической мембране лимфоцитов снижена текучесть анулярной липидной фракции, нарушены межмолекулярные белок-липидные взаимодействия.
4. При персистенции вирусов гепатита В и С имеет место структурная модификация мембраны эритроцитов, характеризующаяся возрастанием микровязкости липидной фазы в ее гидрофобном компартменте, дезорганизацией поверхностных слоев мембраны и угнетением активности Na^+,K^+-АТФазы.
5. Выраженность изменений структуры плазматических мембран лимфоцитов и эритроцитов у больных хроническим вирусным гепатитом (В, С и микст-инфекция В+С) не зависит от таксономической принадлежности возбудителя, длительности и активности патологического процесса.
6. Длительное носительство вируса клещевого энцефалита с клиническими проявлениями заболевания и без таковых сопровождается структурной дезорганизацией липидной фазы плазматической мембраны лимфоцитов в гидрофобном компартменте мембраны в области белок-липидных контактов. Характер и степень выраженности нарушений в плазматической мембране лимфоцитов не зависит от длительности патологического процесса.
7. Изменения структурных характеристик мембраны эритроцитов при длительном носительстве антигена вируса клещевого энцефалита с клиническими проявлениями и без клинической манифестации нейроинфекции характеризуются возрастанием микровязкости как в области интегральной липидной фазы, так и в области анулярных липидов, угнетением активности Na^+,K^+-АТФазы.
8. Нарушения структурных свойств плазматических мембран эритроцитов и лимфоцитов у здоровых доноров под влиянием аполипопротеина А-I,

обладающего свойствами дифенсиновых белков, имеют ту же направленность, что и у больных с персистенцией вирусов клещевого энцефалита и гепатита В и С. Модифицирующее действие аполипопротеина А-I на клеточные мембраны здоровых людей (доноров) более выражено, чем на клеточные мембраны больных.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Некоторые структурные особенности плазматической мембраны лимфоцитов периферической крови при длительной персистенции вируса клещевого энцефалита // Материалы Международного симпозиума «Успехи современного естествознания», г. Сочи, 8-10 октября 2002. - Москва, 2002. – С. 119 (в соавт. с Новицким В.В., Рязанцевой Н.В., Жуковой О.Б. и др.).
2. 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., Жуковой О.Б., Новицким В.В. и др.).
3. Активность ДНК-репарационной системы лимфоцитов периферической крови у пациентов с хронической вирусной персистенцией // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2003. – Т. 13, № 6. – С. 27-29 (в соавт. с Рязанцевой Н.В., Жуковой О.Б., Новицким В.В. и др.).
4. Биофизические особенности мембраны эритроцитов при хроническом носительстве вируса клещевого энцефалита // Вестник Российского государственного медицинского университета - 2003. – Т. 28, №2. - Специальный выпуск: «Материалы Пироговской студенческой научной конференции» - Москва, 2003. – С. 227-228 (в соавт. с Рязанцевой Н.В., Новицким В.В., Жуковой О.Б. и др.).
5. «Гематологические маски» хронического вирусного гепатита // Терапевтический архив. – 2003. – Т. 75, № 11. – С. 28-31 (в соавт. с Рязанцевой Н.В., Белобородовой Э.И., Новицким В.В. и др.).
6. Изменение микровязкости плазматической мембраны лимфоцитов при вирусном гепатите В // Успехи современного естествознания. – 2003. - №11. – С. 89 (в соавт. с Рязанцевой Н.В., Новицким В.В., Наследниковой И.О. и др.).
7. Плазматическая мембрана лимфоцитов как структурно-функциональное звено иммунной системы при развитии вирусной инфекции // Материалы

Межрегиональной научной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения академика АМН СССР С.П. Карпова, г. Томск, 7-10 октября 2003. – Томск, 2003. – С. 103 (в соавт. с Рязанцевой Н.В., Новицким В.В., Жуковой О.Б. и др.).

8. Роль иммунофенотипических и цитогенетических изменений лимфоцитов крови в механизмах хронизации вирусной инфекции // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2003. – Т. 13, № 6. – С. 23-27 (в соавт. с Рязанцевой Н.В., Жуковой О.Б., Новицким В.В. и др.).
9. Структурно-функциональные особенности плазматической мембраны лимфоцитов и эритроцитов при вирусных инфекциях // Сибирский медицинский журнал. – 2003. – Т. 18, № 3. – С. 34-38 (в соавт. с Рязанцевой Н.В., Паниным Л.Е., Наследниковой И.О. и др.).
10. Флуоресцентное зондирование плазматической мембраны лимфоцитов и эритроцитов при персистенции вируса клещевого энцефалита: мониторирование структурных изменений // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2003. – Т. 136, № 8. – С.213-216 (в соавт. с Паниным Л.Е., Рязанцевой Н.В., Новицким В.В. и др.).
11. Хронический вирусный гепатит С: структурно-метаболический и цитогенетический статус лимфоцитов // VI Российский съезд «Врачей инфекционистов», г. Санкт-Петербург, 29-31 октября 2003. - Санкт-Петербург, 2003. – С. 268 (в соавт. с Наследниковой И.О., Рязанцевой Н.В., Жуковой О. Б. и др.).
12. Хронический гепатит В: структура, метаболизм и цитогенетические особенности лимфоцитов // Экспериментальная и клиническая медицина. – 2003. - № 2. – С. 64-67 (в соавт. с Новицким В.В., Рязанцевой Н.В., Наследниковой И.О. и др.).
13. 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., Жуковой О.Б., Рязанцевой Н.В.).
14. Изменение цитогенетического статуса лимфоцитов периферической крови при хронических HBV- и HCV – инфекциях // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2004. – Т. 14, № 1. – С. 37-40 (в соавт. с Рязанцевой Н.В., Жуковой О.Б., Белобородовой Э.И. и др.).
15. Патофизиология иммунных нарушений при хронических вирусных гепатитах // Вторая международная конференция «Патофизиология и совре-

менная медицина», г. Москва, 23-24 апреля, 2004. – Москва, 2004. – С. 154-155 (в соавт. с Жуковой О.Б., Рязанцевой Н.В., Новицким В.В. и др.).

16. Функционально-метаболический статус лимфоцитов периферической крови у больных с длительной персистенцией вирусов // Материалы Межгородской конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии», Санкт-Петербург, 15-16 апреля, 2004 г. – СПб, 2004. – С.48-50 (в соавт. с Наследниковой И.О., Белоконь В.В., Рязанцевой Н.В. и др.).