

На правах рукописи

Чечина Ольга Евгеньевна

**НАРУШЕНИЕ АПОПТОТИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ ЛИМФОЦИТОВ
ПРИ ПЕРСИСТЕНТНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЯХ**

14.00.16 – патологическая физиология

03.00.25 – гистология, цитология, клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Томск - 2005

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

Научные руководители:

доктор медицинских наук

Рязанцева
Наталья Владимировна

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

Новицкий
Вячеслав Викторович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор

Федорова
Татьяна Сергеевна

доктор медицинских наук, профессор,
академик РАМН

Шкурупий
Вячеслав Алексеевич

Ведущая организация:

ГОУ ВПО Новосибирская государственная медицинская академия Росздрава

Защита состоится «__»_____2006 г. в _____ 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 «__»_____2005 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Суханова Г.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Хронические вирусные инфекции являются серьезной проблемой здравоохранения во всем мире и занимают одно из первых мест в инфекционной патологии человека [Львов Д.К., 2002; Серов В.В. и соавт., 2003]. Их значимость определяется высоким темпом роста заболеваемости, частотой хронизации инфекционного процесса, а также тяжелыми осложнениями, возникающими в результате реализации онкогенного потенциала вирусов. К числу таких вирусов относятся возбудители гепатита В и С [Погодина В.В. и соавт., 1986; Антонов П.В., Цинзерлинг В.А., 2001; Жукова Н.Г. и соавт., 2002].

В настоящее время многие вопросы, затрагивающие механизмы возникновения хронической вирусной патологии, остаются открытыми. Например, до конца не выяснены факторы, обуславливающие разные исходы болезни: от полной элиминации инфектогена до длительной бессимптомной циркуляции вируса в макроорганизме [Букринская А.Г., Жданов В.М., 1991; Bramley A.M., 1999]. В связи с этим внимание исследователей уделяется взаимодействию вирусов и иммунной системы организма, которое предопределяет исход инфекционного заболевания [Букринская А.Г., 1986; Ahmed R. et al., 1996; Eckels D.D. et al., 1999; Антонов П.В. и соавт., 2001]. С одной стороны, особенности возникновения и течения хронической вирусной инфекции обусловлены биологическими свойствами самого вируса, а, с другой, – определяются состоянием иммунной системы организма, от адекватности функционирования которой зависят течение и исход заболевания [Погодина В.В. и соавт., 1986; Lerat H. et al., 1998; Bramley A.M., 1999; Апросина З.Г., Серов В.В., 2001; Жукова О.Б. и соавт., 2003].

Ключевую роль в патогенезе формирования вирусных инфекций играют изменение функционального статуса и снижение жизнеспособности иммунокомпетентных клеток. Многие вирусы могут избегать элиминирующего действия иммунной системы, обеспечивая выживание клетки-хозяина, а значит и возможность собственной репликации, используя при этом способности к антигенной мимикрии и интеграции в клеточный геном, а также высокую степень генетической изменчивости иммуногенных эпитопов. Кроме того, вирусы могут снижать экспрессию собственных антигенов на клеточной поверхности, а также оказывать непосредственное влияние на иммунный ответ, вызывая развитие иммуносупрессорных и иммунопатологических реакций [Букринская А.Г., Жданов В.М., 1991; Ивашкин В.Т. и соавт., 2000; Апросина З.Г., Серов В.В., 2001].

Основополагающим механизмом вирусной персистенции является модуляция программированной клеточной смерти [Ярилин А.А., 1996; Маянский А.Н. и соавт., 1997; Nay S., Kannourakis G., 2002]. Апоптотическая гибель играет существенную роль в иммунных процессах: селекция клонов в ходе развития иммунокомпетентных клеток, иммунологическая толерантность и реализация иммунного ответа. Очевидно, что различные классы иммунокомпетентных клеток

обладают индивидуальной чувствительностью к разнообразным апоптогенным стимулам. Кроме того, иммунокомпетентные клетки не только принимают непосредственное участие в реализации инфекционного процесса, но и сами являются мишенью для действия вирусов [Буеверов А.О. и соавт., 2000; Апросина З.Г., Серов В.В., 2001].

Данные литературы о модуляции апоптотической программы иммунокомпетентных клеток при длительном вирусоносительстве, в частности при вирусных гепатитах и клещевом энцефалите, весьма немногочисленны, что не позволяет составить целостную картину о роли нарушений регуляции и реализации апоптоза в патогенезе формирования персистентных вирусных инфекций [Дмитриева Е.В. и соавт., 2001; Мамаев С.Н., 2002]. На сегодняшний день известно, что вирусы способны кодировать белки-индукторы или ингибиторы апоптоза, действующие на различные пути реализации апоптотической гибели. Стратегия модуляции апоптоза иммунных клеток вирусами сводится к модифицированию рецепторопосредованного сигнала, регуляции клеточного цикла, процессов ДНК-репарации, транскрипции, изменению синтеза p53, Bcl-2, каспаз и др., что отражается на жизнеспособности и функциональных возможностях лимфоцитов [Searle J. et al., 1987; Апросина З.Г., 1996; Буеверов А.О. и соавт., 2000; Дмитриева Е.В. и соавт., 2002]. Исследование тонких механизмов вирусной модуляции апоптоза иммунокомпетентных клеток, причин развития той или иной формы вирусной инфекции, поиск новых подходов этиотропной и патогенетической терапии остаются наиболее важными направлениями в настоящий период.

В связи с этим возникает необходимость проведения дифференцированного исследования реализации апоптоза лимфоцитов периферической крови, а также чувствительности различных субпопуляций Т-клеток в условиях длительной вирусной персистенции.

Цель исследования: установить характер нарушений апоптотической реакции лимфоцитов при персистентных вирусных инфекциях.

Задачи исследования:

1. Выявить общие закономерности и особенности спонтанного и активационного апоптоза лимфоцитов периферической крови у пациентов с хроническим вирусным гепатитом В, С и длительной антигемией вируса клещевого энцефалита.
2. Провести дифференцированную оценку выраженности программируемой гибели регуляторных и эффекторных клеток Т-звена иммунитета при персистентных вирусных инфекциях.
3. Оценить чувствительность лимфоцитов, полученных у пациентов с длительным носительством вирусов гепатита В, С и клещевого энцефалита, к индукторам апоптоза *in vitro*.
4. Установить роль нарушения апоптотической реакции лимфоцитов в иммунопатогенезе персистентных вирусных инфекций.

Научная новизна. В настоящей работе впервые рассмотрен вопрос о характере нарушений реализации апоптотической программы гибели лимфоцитарных клеток периферической крови при клинически выраженной и

бессимптомной персистенции вирусов гепатита В, С и клещевого энцефалита с позиции вскрытия иммунопатогенеза длительного вирусоносительства. Проведена дифференцированная оценка апоптотической реакции $CD4^+$ - и $CD8^+$ -лимфоцитов при персистентных вирусных инфекциях. Установлено, что персистенция вируса гепатита С сопровождается повышением чувствительности Т-хелперов к индукции апоптоза, тогда как у больных хроническим микст-гепатитом В+С и носителей вируса клещевого энцефалита реализация апоптотической программы $CD4^+$ -клеток подавлена. Получены новые данные, демонстрирующие ингибирование апоптоза $CD8^+$ -лимфоцитов у пациентов с клещевой нейроинфекцией. Впервые показано, что чувствительность лимфоцитов, выделенных из венозной крови пациентов с персистентным течением вирусных инфекций, к проапоптотическому влиянию различных модуляторов апоптоза (бессывороточная среда инкубации, дексаметазон, этопозид) *in vitro* значительно повышена по сравнению с аналогичными характеристиками лимфоцитов у здоровых доноров.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные данные фундаментального характера о нарушении апоптотической реакции лимфоцитов периферической крови у пациентов с персистентными вирусными инфекциями раскрывают новые иммунопатологические аспекты хронизации инфекционного процесса при гепатитах В, С и клещевом энцефалите. Результаты исследования могут быть положены в основу разработки новых подходов к прогнозированию клинического течения и исхода инфекционного процесса, вызванного возбудителями гепатита В, С и вирусом клещевого энцефалита, а также патогенетически обоснованных методов профилактики и коррекции нарушений со стороны клеточного звена системы иммунитета в условиях хронизации вирусных инфекций.

Положения, выносимые на защиту:

1. При хроническом вирусном гепатите В и С, длительной антигенемии вируса клещевого энцефалита дисбаланс Т-клеточного звена иммунитета сопряжен с нарушением реализации апоптотической программы лимфоцитарных клеток.
2. При длительной вирусной персистенции выраженность апоптотической реакции регуляторных и эффекторных лимфоцитов различна.
3. Механизмы нарушения апоптотической реакции лимфоцитов у пациентов с персистентными вирусными инфекциями (хроническим вирусным гепатитом В и С, длительной антигенемией вируса клещевого энцефалита) связаны с нарушением чувствительности лимфоцитарных клеток к проапоптогенным стимулам.

Апробация и реализация работы. Результаты проведенных исследований докладывались и обсуждались на Межгородской конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии» (Санкт-Петербург, 2004), Второй Всероссийской конференции «Компенсаторно-приспособительные процессы: фундаментальные, экологические и клинические аспекты» (Новосибирск, 2004), V и VI международном конгрессе молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» (Томск, 2004; 2005), Межгородской конференции «Актуальные

проблемы патофизиологии» (Санкт-Петербург, 2005), Второй Международной конференции «Молекулярная медицина и биобезопасность» (Москва, 2005).

В работе приводятся результаты исследований, поддержанных Советом при Президенте РФ для поддержки ведущих научных школ РФ по проблеме «Молекулярные механизмы нарушения структуры, метаболизма и функции клеток крови при патологии» (НШ-1051.2003.4), а также результаты научно-исследовательской работы «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 в рамках ФЦНТП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники на 2002-2006 годы») и научно-исследовательской работы «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 в рамках ФЦНТП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники на 2002-2006 годы»).

Основные результаты диссертационного исследования включены в лекционный курс по патологической физиологии («Патофизиология клетки», «Патофизиология инфекционного процесса», «Роль апоптоза клетки в патологии») для студентов лечебного и педиатрического факультетов ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 15 работ, из которых 5 – в центральных рецензируемых журналах.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 131 странице машинописного текста и состоит из введения, четырёх глав, выводов и списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 13 рисунками и 7 таблицами. Библиографический указатель включает 223 источника, из них 58 отечественных и 165 иностранных.

ХАРАКТЕРИСТИКА КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В настоящей работе представлены результаты комплексного обследования 119 человек (64 мужчин и 55 женщин в возрасте от 18 до 50 лет) с длительной персистенцией вирусов гепатита В и С, клещевого энцефалита (таблица).

Обследование проводилось до назначения специфической противовирусной и иммунокорректирующей терапии. Пациенты находились на диспансерном учете и стационарном лечении в гастроэнтерологическом отделении Томской областной клинической больницы (главный врач – Заслуженный врач РФ Б.Т. Серых) и инфекционном отделении госпитальных клиник ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава (главный врач – Заслуженный врач РФ, к.м.н. В.М. Шевелёв). Набор клинического материала проводился под руководством заведующей кафедрой терапии ФПК и ППС ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава, Заслуженного врача РФ, д.м.н., профессора Э.И. Белобородовой, профессора кафедры неврологии и нейрохирургии ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава, д.м.н. Н.Г. Жуковой и

заведующего кафедрой инфекционных болезней ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава, д.м.н., профессора А. В. Лепёхина.

Распределение здоровых доноров и пациентов с персистенцией вирусов гепатита В, С и клещевого энцефалита в соответствии с использованными иммуноцитохимическими и цитофлуориметрическими методами исследования лимфоцитов периферической крови

Методы исследования	Группы обследованных					
	Здоровые доноры	Пациенты с хроническим вирусным гепатитом В	Пациенты с хроническим вирусным гепатитом С	Пациенты с хроническим вирусным гепатитом В+С	Пациенты с хронической антигенемией вируса клещевого энцефалита	
Определение количества лимфоцитов крови, экспрессирующих CD3-, CD4-, CD8-, CD22- и CD56-маркёры	19	19	31	19	21	
Цитофлуориметрическая оценка спонтанного и активационного апоптоза общей популяции лимфоцитов периферической крови в аннексиновом тесте	23	18	24	11	16	
Оценка апоптоза CD4 ⁺ - и CD8 ⁺ -субпопуляции лимфоцитов периферической крови в аннексиновом тесте	18	11	14	9	12	
Модуляция апоптоза лимфоцитов крови in vitro	лишением ростовых факторов	16	7	16	10	11
	добавлением этопозида	19	12	16	9	12
	добавлением дексаметазона	17	12	19	9	10

В исследовании участвовали 85 больных вирусным гепатитом В, С и В+С (по МКБ-10 рубрики В18.1, В18.2, В18.8). Клинические группы были сформированы на основании классификации, принятой Всемирным конгрессом гастроэнтерологов в Лос-Анджелесе (1994): 1) больные хроническим гепатитом В умеренной и слабовыраженной степени активности – 24 человека; 2) больные

хроническим гепатитом С умеренной и слабовыраженной степени активности – 42 человека; 3) больные хроническим микст-гепатитом В+С умеренной и слабовыраженной степени активности – 19 человек.

Активность вирусного гепатита устанавливали с помощью пункционной биопсии печени. Выраженность степени некроза паренхимы печени и воспалительной клеточной инфильтрации определяли с помощью индекса гистологической активности (ИГА) в соответствии с классификацией R. Knodell [1981]. Давность хронического вирусного гепатита составляла от 1 года до 16 лет (в среднем – 5 ± 2 года).

Диагноз хронического вирусного гепатита устанавливали при наличии симптомов гепато-, спленомегалии, а также синдромов холестаза и цитолиза. Серологически диагноз подтверждали выявлением в крови маркеров вируса гепатита В (HBV) (HBs-антиген, HBe-антиген, анти-Hbcor Ig M, анти-Hbcor суммарные) и гепатита С (HCV) (анти-HCV Ig к cor, С-протеину, неструктурным белкам NS-3, NS-4, NS-5, анти-HCV Ig M), а также ДНК вируса гепатита В, РНК вируса гепатита С методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Кроме того, согласно клинической классификации, предложенной Н.Г. Жуковой и соавт. [2002], в программу исследования были включены 34 пациента с длительной персистенцией вируса клещевого энцефалита (КЭ). У лиц, отнесенных к данной клинической категории, в течение 6-8 месяцев после острого периода инфекционного процесса при полном отсутствии клинических проявлений в крови обнаруживалась РНК вируса КЭ, выявлялся антиген вируса КЭ, а также повышенный уровень специфического Ig G. Кроме того, в данную группу были включены пациенты с хронической (8-30 месяцев) антигемией вируса КЭ с остаточными клиническими проявлениями. Диагноз КЭ (по МКБ-10 рубрика А84.0) устанавливали на основании факта присасывания или обнаружения ползающих клещей, наличия клинических признаков (острое начало, общеинфекционный синдром), а также оценки неврологического статуса. Верификацию диагноза осуществляли с помощью выявления антигена вируса КЭ в клеще и крови у пациентов с использованием иммуноферментного анализа (ИФА), реакции непрямой гемагглютинации (РНГА), а также специфических антител классов IgM и IgG к антигену вируса КЭ (ИФА) и РНК вируса КЭ с помощью ПЦР.

В контрольную группу были включены 35 здоровых доноров с аналогичными характеристиками по полу и возрасту, не страдавшие инфекционными заболеваниями и не предъявлявшие на момент обследования жалоб соматического профиля.

Материалом исследования являлась венозная кровь, стабилизированная гепарином (25 Ед/мл).

Определение общего количества лейкоцитов периферической крови и подсчет их отдельных морфологических форм проводили стандартными гематологическими методами [Меньшиков В.В., 1987].

Оценку содержания CD3⁺-, CD4⁺-, CD8⁺-, CD22⁺-, CD56⁺-несущих лимфоцитов осуществляли иммуноцитохимическим методом с помощью набора реагентов фирмы “Dako” (Дания). При микроскопии идентифицировали

окрашенный продукт иммуноферментной реакции, образовавшийся в местах связывания выявляемых антигенов. Положительно окрашенными считались лимфоциты, по окружности которых продукт реакции занимал не менее трети. Проводили подсчет 200 клеток, определяли процент положительно окрашенных клеток [Тотолян А.А. и соавт., 2002].

Мононуклеары выделяли в стерильных условиях из цельной венозной крови методом градиентного центрифугирования с использованием Ficoll-Paque («Pharmacia», Швеция) ($\rho=1,077 \text{ г/см}^3$) [Натвиг Дж. и соавт., 1980]. Выделенные клетки культивировали в течение 18 ч при температуре 37° и 5% CO_2 в полной культуральной среде (90% RPMI-1640 («Вектор-Бест», Новосибирск), 10% инактивированная эмбриональная телячья сыворотка («Биолот», Санкт-Петербург), 0,3 мг/мл L-глутамин) без митогена или с добавлением 10 мкг/мл фитогемагглютинаина (ФГА) («Difco», Германия) для активации лимфоцитов [Хаитов Р.М. и соавт., 1995]. Затем проводили оценку уровня спонтанного и активационного апоптоза в общей фракции лимфоцитарных клеток, а также CD4^+ - и CD8^+ -субпопуляциях лимфоцитов в аннексиновом тесте. Для этого культивированные клетки отмывали и добавляли 5 мкл стандартных моноклональных антител (МКАТ) к CD4 , CD8 , меченных фикоэритрином (ФЭ) («Caltag», США), инкубировали в течение 30 мин. Затем клетки отмывали и ресуспендировали (10^6 в 1 мл) в аннексиновом буфере («Caltag», США), содержащем аннексин V, меченный ФИТЦ. После 15 мин инкубации клетки подвергали проточной лазерной цитофлуориметрии на проточном цитометре Erics XL («Beckman Coulter», Франция) (рис. 1) [Ярилин А.А. и соавт., 2000].

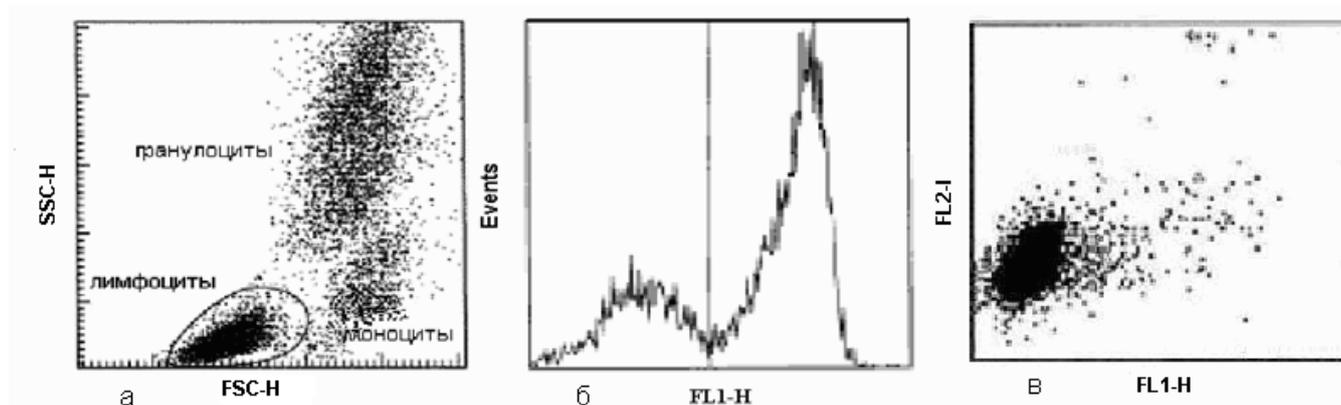


Рис. 1. Анализ апоптоза лимфоцитов периферической крови методом проточной цитометрии. Иммунофлуоресцентное окрашивание аннексином V-ФИТЦ

а – выделение гейта лимфоцитов по сигналам бокового (SSC-H) и переднего светорассеивания (FSC-H); б – одномерная гистограмма, на которой по оси абсцисс (FL1-H) отмечается интенсивность флюоресценции клеток, по оси ординат (FL2-I) – количество клеток с определённой интенсивностью флюоресценции (справа находятся апоптотические клетки); в – гистограмма, на которой продемонстрирован апоптоз общей популяции лимфоцитов

В рамках диссертационной работы проводили оценку реализации апоптотического процесса лимфоцитов периферической крови у пациентов с персистенцией вирусов гепатита В и С, клещевого энцефалита, а также у здоровых доноров *in vitro* в условиях инкубации лимфоцитарных клеток с модуляторами апоптоза. Для этого выделенные мононуклеары периферической крови культивировали в 96-луночных планшетах. В каждую лунку вносили суспензию клеток (1×10^5 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 Roger”, Франция) в концентрации 10^{-6} моль/мл. Клетки инкубировали в течение 18 ч при температуре 37° и 5% CO_2 . Затем с помощью ФИТЦ-меченного аннексина V методом проточной лазерной цитометрии регистрировали апоптоз как указано выше.

Анализ полученных данных осуществляли с помощью программы Statistica for Windows Version 6.0 (StatSoft Inc., США). Для каждой выборки вычисляли выборочное среднее, стандартное отклонение. Проверка нормальности выборок проводили с помощью оценок гипотез о нормальности закона распределения полученных данных (критерий Колмогорова-Смирнова). При нормальном распределении переменных проверка гипотезы о равенстве выборочных средних выполняли с использованием t-критерия Стьюдента для независимых выборок. В случае отсутствия согласия данных с нормальным распределением для оценки различий между зависимыми выборками применяли непараметрический критерий Вилкоксона. Для оценки достоверности различий независимых выборок использовали ранговый критерий Манна-Уитни. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$ [Лакин А.В., 1989].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Особое значение при изучении патогенеза хронических вирусных инфекций в настоящее время отводится апоптозу [Tran G. et al., 1997; Исаева М.П. и соавт., 1998; Crovatto M. et al., 2000]. Общеизвестная роль запрограммированной клеточной гибели при многих физиологических и патологических состояниях в последние годы подтверждена значительным количеством исследований в этой области [Searle J. et al., 1987; Буеверов А.О. и соавт., 2000; Дмитриева Е.В. и соавт., 2002]. При вирусной инфекции апоптоз является результатом как прямого, так и опосредованного иммунной реакцией воздействия вируса [Дмитриева Е.В. и соавт., 2003]. Многие вирусы, в том числе возбудители гепатита В, С и клещевого энцефалита, способны модулировать программу гибели клетки в соответствии со своей стратегией выживания, обуславливая тем самым формирование иммуносупрессорных и иммунопатологических реакций [Crovatto M. et al., 2000].

Учитывая важную роль апоптоза в иммунных реакциях, целью настоящего исследования явилось получение новых данных о механизмах формирования длительной персистенции вирусов в макроорганизме путем концентрации

внимания на оценке реализации апоптотической программы лимфоцитарных клеток в присутствии вирусов гепатита В, С и клещевого энцефалита, обладающих высоким потенциалом к формированию хронического инфекционного процесса. При этом особый интерес для нас представлял тот факт, что вирусы способны оказывать модулирующее действие на апоптотическую программу лимфоцитарных клеток, которые, с одной стороны, играют решающую роль в противовирусном иммунном ответе, а, с другой, – сами являются мишенью для действия таких возбудителей как вирусы гепатита В и С, клещевого энцефалита [Gowans E.J., 2000; Ивашкин В.Т. и соавт., 2001].

При хроническом инфекционном процессе эффекторы Т-клеточного иммунитета недостаточно результативны. Высокая сенсibilизация Т-лимфоцитов к вирусным антигенам характерна для острого инфекционного процесса, который завершается элиминацией возбудителя, но не для больных с исходом инфекции в хроническую форму. В последнем случае реакции выражены слабее и явно недостаточны для эрадикации вируса [Matloubian M.R. et al., 1994; Fan X.G. et al., 1998]. Указанный факт определил наш интерес к реакциям клеточного иммунитета.

Проведенный анализ количественных показателей Т-лимфоцитарного звена показал, что у пациентов с персистенцией вирусов гепатита В, С и клещевого энцефалита отмечалось значительное сокращение численности CD3⁺-лимфоцитов. Так, у больных хроническим вирусным гепатитом В относительное содержание CD3-экспрессирующих клеток достигало 54,00±1,78% (p<0,05), у пациентов с вирусным гепатитом С – 48,56±1,38% (p<0,05), у больных микст-гепатитом В+С – 46,60±2,82% (p<0,01), у пациентов с клещевой нейроинфекцией – 57,13±1,46% (p<0,05) (при норме 62,42±3,07%). Аналогичные результаты были получены и другими исследователями [O'Brien I. et al., 1986; Peters M. et al., 1991]. Снижение уровня Т-лимфоцитов может быть обусловлено непосредственным цитопатическим действием вируса на данные клетки, блокадой рецепторов Т-лимфоцитов циркулирующими иммунными комплексами, сиаловыми кислотами и другими метаболитами воспалительной реакции, а также перераспределением Т-лимфоцитов в связи с их миграцией в орган мишень [Rehermann B. et al., 1996; Di Rosa F. et al., 1998].

Вирусной персистенции содействует наличие дополнительных резервуаров инфекции, прежде всего в лимфоидной ткани. Подобные механизмы могут использоваться вирусами гепатита В, С и клещевого энцефалита, что отражает тропизм и способность этих вирусов реплицироваться в клетках иммунной системы [Погодина В.В., 1986; Stoll-Beker S. et al., 1997]. Вирус находит здесь не только убежище. Это дополнительная зона реализации его агрессивного потенциала. Вирусная репликация вызывает функциональные нарушения лимфоцитов, которые ведут к развитию патологии иммунной системы и ослабляют ее вирусэлиминирующий потенциал [Исаева М.П. и соавт., 1998; Crovatto M. et al., 2000]. Это, в частности, зависит от дисбаланса эффекторных клеток.

Проведенное нами исследование субпопуляционного состава Т-клеток у пациентов с хроническим персистированием вирусов клещевого энцефалита,

гепатита В и С позволило выявить изменения в системе Т-звена иммунитета, которые проявлялись повышением количества CD8-позитивных лимфоцитов на фоне сокращения численности CD4⁺-клеток, а также снижением у всех пациентов значений иммунорегуляторного индекса. Уменьшение числа Т-хелперов и возрастание уровня Т-супрессоров, вероятно, обуславливает формирование толерантности к вирусным антигенам [Di Rosa F., Barnaba V., 1998; Bramley A.M. et al., 1999].

Низкий уровень экспрессии молекул CD4, выявленный у больных хроническим вирусным гепатитом С и клещевым энцефалитом ($21,42 \pm 0,95\%$, $p < 0,05$ и $19,44 \pm 1,28\%$, $p < 0,05$ соответственно при норме $31,15 \pm 3,66\%$), вероятно, свидетельствует о слабом Т-клеточном пролиферативном ответе на вирусные антигены. При этом нарушение баланса регуляторных клеток CD4⁺-популяции определяет высокий уровень персистенции вирусов [Fan X.G. et al., 1998]. Преобладание Т-хелперов I типа при остром инфекционном процессе коррелирует с тенденцией к выздоровлению и элиминацией возбудителя. Напротив, доминирование Т-хелперов II типа, ассоциируемое с ослаблением эффекторного звена Т-клеточного иммунитета и активацией малоэффективного в данном случае В-звена, содействует хронизации инфекционного процесса [Matloubian M.R. et al., 1994]. Подобный механизм хронизации инфекции характерен для HBV, Нве-антиген которого направляет дифференцировку CD4⁺-клеток в сторону Th2-пути [Ивашкин В.Т. и соавт., 2001]. При хронической HCV-инфекции получены данные о сходных нарушениях равновесия в активации CD4⁺-лимфоцитов. Предполагается, что в ингибировании экспрессии клетками CD4-молекулы определенную роль играют провоспалительные цитокины, в частности TNF- α и IL-1 β [Маммаев С.Н., 2002].

Ведущую роль в ограничении репликации вируса и элиминации его из организма играют CD8⁺-лимфоциты. Их образование вызывают вирусные антигены в комплексе с молекулами МНС I класса. Эти молекулы экспрессируются практически всеми клетками макроорганизма, благодаря чему обеспечивается идентификация антигена и элиминация клеток, зараженных вирусом, путем цитолиза или апоптоза [Koziel M.J. et al., 1995].

Обнаруженное нами увеличение относительной ($30,54 \pm 2,03\%$, $p < 0,05$ при норме $25,08 \pm 1,77\%$) и абсолютной ($0,71 \pm 0,08$ Г/л, $p < 0,01$ при норме $0,44 \pm 0,03$ Г/л) численности CD8⁺-популяции лимфоцитарных клеток у пациентов с длительной персистенцией вируса клещевого энцефалита, вероятно, свидетельствует, с одной стороны, об усилении цитотоксических реакций, а, с другой, – о нарушении регуляции иммунного ответа. Недостаточная эффективность цитотоксического ответа, несмотря на повышенное количество CD8-позитивных лимфоцитов, при хронической форме инфекционного процесса может быть обусловлена антигенной Т-эпитопной вариабельностью [Маянский А.Н. и соавт., 1998]. Кроме того, имеет значение сродство антигенных пептидов к презентующим их молекулам МНС, сокращение внутриклеточного пула вируса до уровня, невосприимчивого Т-лимфоцитами, вирусиндуцированное ослабление экспрессии МНС на инфицированных клетках, клональная анергия Т-лимфоцитов [Binder D., Kundig T.M., 1991; Koziel M.J. et al., 1995; Rehmann B. et al., 1996;

Seiler P. et al., 1998]. Все эти механизмы, широко обсуждающиеся в связи с феноменом вирусной персистенции, повышают устойчивость вирусов к эффекторам иммунитета, содействуя тем самым стабилизации инфекции в организме.

Большое значение в противовирусной защите организма отводится НК-клеткам. Эти лимфоциты являются одним из основных факторов естественной неспецифической резистентности [Berke G., 1997]. Выявленное нами увеличение относительного количества CD56⁺-клеток у пациентов с HBV-инфекцией, микст-гепатитом В+С и клещевой нейроинфекцией (14,44±2,14%, p<0,05; 15,50±1,75%, p<0,05 и 16,60±1,14%, p<0,05 соответственно при норме 9,46±1,23%) и абсолютного числа CD56⁺-лимфоцитов у пациентов с хронической HCV-инфекцией (0,28±0,02 Г/л, p<0,05 при норме 0,18±0,03 Г/л), вероятно, свидетельствует о компенсаторной активации системы неспецифической резистентности в ответ на вирусную инфекцию и может служить благоприятным прогностическим признаком заболевания. Однако на фоне недостаточности Т-клеточного звена иммунитета их функция может быть неполноценна. Повышение активности CD56⁺-клеток может играть важную роль в патогенезе повреждающего действия иммунокомпетентных клеток на органы-мишени, а также хронизации вирусной инфекции [Borrow P., 1997; Bramley A.M. et al., 1999].

Роль гуморального звена иммунитета в противовирусном ответе менее значима. Вируснейтрализующие антитела при хронической вирусной инфекции недостаточно эффективны [Зуев В.А., 1988; Маянский А.Н. и соавт., 1998]. С одной стороны, это обусловлено тем, что иммуноглобулины связывают лишь внеклеточный вирус [Chisari F.V., 1995; Львов Д.К., 1996; Игнатова Т.М., Серов В.Б., 2000]. С другой стороны, это может быть обусловлено антигенной гипервариабельностью оболочечных белков, благодаря которой минорные иммунорезистентные вирусные клоны ускользают от нейтрализующих антител, обретая лидерство в патологическом процессе [Loriot M.A., Carman W.F., 1997; Круглов И.В. и соавт., 2002]. Замечено, например, что вируснейтрализующие антитела, продуцируемые в раннем периоде хронического гепатита С, не эффективны против HCV-изолятов, полученных от тех же больных в более поздние сроки [Porh A., 1997].

Вышеизложенное подтверждается полученными нами данными: у всех обследованных пациентов количество CD22⁺-лимфоцитов оказалось в пределах контрольных значений, что, вероятно, может свидетельствовать о минимальном участии В-клеток в противовирусном ответе, либо о недостаточной эффективности В-звена иммунитета на фоне хронической вирусной инфекции. Подобные предположения высказывались и другими исследователями [Погодина В.В. и соавт., 1986; Bramley A.M. et al., 1999].

В целом, результаты проведенного нами исследования согласуются со взглядом большинства авторов [Погодина В.В. и соавт., 1986; Ahmed R. et al., 1996; Маянский А.Н. и соавт., 1998; Круглов И.В. и соавт., 2002] на особенности взаимодействия вирусов с клетками иммунной системы в условиях хронического инфекционного процесса: на длительное присутствие вирусного агента в

организме в большей степени реагируют Т-клеточное звено иммунитета и система неспецифической резистентности.

Важным механизмом хронизации вирусной инфекции является вирусиндуцированная модуляция апоптотической программы гибели иммунокомпетентных клеток [Feldman G., 1997; Аруин Л.И., 1998; Буеверов А.О. и соавт., 2000]. Дефект апоптоза может быть одной из причин повышенной жизнеспособности инфицированных вирусом клеток [Solary E. et al., 1996], что приводит к хронизации процесса и обуславливает недостаточную эффективность терапии.

При изучении показателей, характеризующих степень выраженности программированной гибели лимфоцитарных клеток, у пациентов с длительной персистенцией вируса КЭ было зарегистрировано обогащение фракции лимфоцитов, подвергшихся спонтанному апоптозу ($21,83 \pm 1,67\%$, $p < 0,01$ при норме $11,23 \pm 1,00\%$). Подобная реакция может быть связана с вирусиндуцированным повышением чувствительности лимфоцитарных клеток к Fas-опосредованному апоптозу. Например, О.Б. Жуковой и соавт. [2003] было обнаружено увеличение уровня экспрессии молекул CD95 на лимфоцитах периферической крови у пациентов с длительной персистенцией вирусов гепатита С, а также клещевого энцефалита. С другой стороны, вышеуказанные изменения могут быть обусловлены активацией элиминирующих реакций организма, направленных на уничтожение зараженных вирусом клеток.

Как показали результаты настоящего исследования, у пациентов с хроническим вирусным гепатитом В и В+С отмечалось двукратное снижение относительного ($5,63 \pm 1,10\%$, $p < 0,01$ и $6,01 \pm 1,85\%$, $p < 0,05$ соответственно) и абсолютного ($0,12 \pm 0,02$ Г/л, $p < 0,01$ и $0,15 \pm 0,04\%$, $p < 0,05$ соответственно) числа лимфоцитов, находящихся на ранних стадиях апоптотической гибели. Это может свидетельствовать, на наш взгляд, о наличии у вирусов гепатита В и С возможностей, позволяющих угнетать реализацию апоптотической программы, что, несомненно, для них выгодно, поскольку, сохраняя жизнь клетке-хозяину, вирусы обеспечивают себе оптимальные условия для дальнейшей персистенции.

Одним из механизмов ингибирования апоптоза может являться снижение чувствительности лимфоцитов к Fas-индуцированному апоптозу, обусловленное нарушением функции данного рецептора, дисбалансом между уровнями экспрессии мембранной и растворимой форм Fas-рецептора и Fas-L на фоне вирусной инфекции [Ohishi M. et al., 1995]. Кроме того, угнетение апоптоза может быть связано с изменениями, возникающими после активации данного рецептора. Например, антиапоптотическая стратегия HBV и HCV сводится к подавлению функции белка p53, инактивации каспаз, а также усилению экспрессии ингибитора апоптоза Bcl-X_L [Lin Y. Et al., 1997; Rust C., Gores G.J., 2000].

Как известно, индукция апоптоза может быть вызвана действием на лимфоцитарные клетки митогена [Ярилин А.А., 1996]. Изучая уровень активационного апоптоза в 18-часовой культуре стимулированных лимфоцитарных клеток периферической крови у пациентов с хроническим гепатитом В, мы обнаружили увеличение содержания лимфоцитов, находящихся на ранней стадии реализации апоптотической программы ($17,22 \pm 2,74\%$, $p < 0,01$), и

снижение индекса стимуляции апоптоза ($0,34 \pm 0,11$ усл. ед., $p < 0,01$). Усиление активационного апоптоза лимфоцитов при хроническом гепатите В, вероятно, является свидетельством защитного потенциала организма, направленного на прекращение дальнейшего распространения возбудителя.

При хроническом гепатите С были выявлены противоположные изменения: содержание апоптотических клеток снижалось ($7,28 \pm 0,66\%$, $p < 0,05$), тогда как индекс стимуляции апоптоза заметно возрастал ($1,35 \pm 0,13$ усл. ед., $p < 0,05$). Уменьшение количества лимфоцитов, вступивших в активационный апоптоз, у больных хроническим гепатитом С, по-видимому, является результатом поломки естественной реализации программируемой клеточной гибели, обеспечивая тем самым персистенцию вируса в организме.

Апоптотический ответ лимфоцитов периферической крови на стимуляцию ФГА у пациентов с микст-гепатитом В+С носил характер, аналогичный изменениям данного показателя у больных хроническим гепатитом С, что, вероятно, свидетельствует о преобладающем влиянии HCV на иммунологическую реактивность по сравнению с вирусом гепатита В.

В процессе иммунного ответа осуществляется коррекция соотношения функциональных субпопуляций Т-клеток, где в качестве инструмента используется неравномерность вовлечения CD4⁺- и CD8⁺-клеток в пролиферацию и апоптоз [Григорьева Т.Ю. и соавт., 2002]. В настоящее время известно, что при формировании противовирусного иммунитета пролиферация CD4⁺-лимфоцитов способствует образованию, главным образом, Т-хелперов I типа. Эти клетки, продуцируя IFN- γ 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 происходит активация неэффективного в данной ситуации В-звена иммунитета и подавление пролиферации Т-хелперов I типа, а, следовательно, и цитотоксических Т-клеточных реакций. Поэтому поломка регуляторных механизмов апоптотической программы Т-хелперов может приводить к выраженному иммунному дисбалансу, способствующему хронизации инфекционного процесса.

Подобные нарушения были отмечены нами у пациентов с HCV-инфекцией: уровень спонтанной гибели CD4-экспрессирующих лимфоцитов ($39,17 \pm 3,96\%$, $p < 0,05$) и индекс стимуляции апоптоза ($1,28 \pm 0,08$ усл. ед., $p < 0,01$) значительно возросли. Указанный факт отражает несостоятельность регуляторных механизмов иммунного ответа и может явиться одной из причин снижения численности CD4⁺-клеток, выявленном при иммунофенотипировании лимфоцитов, обуславливая тем самым длительное пребывание вируса гепатита С в макроорганизме.

В то же время оценка уровней спонтанного и активационного апоптоза Т-хелперных клеток у больных хроническим микст-гепатитом В+С и клещевой

нейроинфекцией показала, что на фоне обеднения Т-хелперной фракции численность CD4⁺-лимфоцитов, подвергшихся апоптозу, снижалась (спонтанному апоптозу подверглись 9,24±0,06%, p<0,05; активационному – 12,44±1,96%, p<0,01). Выявленные изменения могут быть результатом вирусиндуцированного срыва компенсаторных механизмов регуляции в системе иммунитета и преобладания антиапоптотического потенциала вируса над защитными клеточными реакциями. Сокращение численности CD4⁺-клеток, по-видимому, связано не с апоптозом, а с нарушением образования Т-клеток, дифференцировки “наивных” Т-лимфоцитов, либо с ослаблением экспрессии CD4-корцепторов.

Апоптотическая чувствительность лимфоцитарных клеток, вероятно, зависит от этиологической характеристики возбудителя. На фоне персистенции вируса гепатита С CD8⁺-клетки обладают, по-видимому, меньшей чувствительностью к апоптогенным стимулам, чем CD4⁺-лимфоциты. Так, у пациентов с хронической HCV-инфекцией с помощью аннексинового теста было обнаружено, что уровень спонтанного (24,77±1,20%, p>0,05) и активационного (28,56±2,50%, p>0,05) апоптоза в CD8⁺-субпопуляции лимфоцитарных клеток не отличался от контрольных характеристик, также как и общая численность супрессорной фракции лимфоцитов. В то же время у пациентов с клещевой нейроинфекцией была зафиксирована аналогичная тенденция, что и в CD4⁺-лимфоцитарной популяции: изучаемые показатели апоптотической популяции лимфоцитов снижались в 2 раза (уровень спонтанного апоптоза соответствовал 0,27±0,03 Г/л, p<0,05, активационного – 0,28±0,02%, p<0,01), общее же количество CD8-позитивных клеток увеличивалось (0,71±0,08 Г/л, p<0,01). Приведенные выше данные свидетельствуют о том, что вирусы гепатита С и клещевого энцефалита, по-видимому, используют разные механизмы влияния на реализацию апоптотической программы и становление хронического инфекционного процесса.

Причины большей чувствительности хелперных лимфоцитов к индукции апоптоза изучены мало. Одним из возможных механизмов обнаруженных изменений, по мнению Т.Ю. Григорьевой и соавт. [2002], может являться выраженная экспрессия рецептора TNF 1-го типа (TNFR1, CD120a). В то же время при изучении системы Fas-R – Fas-L экспрессия Fas-R преобладает на изолированных CD8⁺-клетках, а Fas-L – на изолированных CD4⁺-клетках. По-видимому, резкие различия в чувствительности к индукции апоптоза, обнаруженные при работе с изолированными CD4⁺- и CD8⁺-лимфоцитами, проявились они *in vivo*, вызывали бы существенный дисбаланс в популяции активированных и эффекторных Т-клеток. Поэтому наблюдаемое при культивировании неразделенных мононуклеаров сглаживание этих различий должно играть благоприятную роль, обеспечивая оптимальное соотношение CD4⁺- и CD8⁺-клеток в апоптотической фракции лимфоцитов [Григорьева Т.Ю. и соавт., 2002].

Таким образом, нарушение реализации апоптотической программы лимфоцитов (особенно регуляторных и цитотоксических Т-клеток) является,

вероятно, одной из основных причин несостоятельности иммунного ответа при вирусной интервенции и формирования хронического инфекционного процесса.

Вирусы для обеспечения собственного выживания обладают набором средств, помогающих им преодолевать сложный комплекс защитных механизмов макроорганизма, направленных не только на элиминацию самого вируса, но и содержащих его клетки. Одним из таких средств является вирусопосредованная модуляция программы гибели клетки [Bertin J. et al., 1996; Granville D. J. et al., 1998; Stark G. R. et al., 1998; Jan J. T. et al., 2000].

Феномен апоптоза является результатом действия различных факторов, приводящих к гибели клетки. К настоящему времени известно, что апоптоз могут вызывать как внутриклеточные сигналы, так и внешние, опосредующие свое действие через рецепторные системы. В связи с этим физиологические регуляторы апоптоза клетки вызывают повышенный интерес исследователей.

Ростовые факторы считаются наиболее многочисленной группой биологически активных веществ, влияние которых на процесс гибели клетки интенсивно изучается и считается доказанным. Например, выявлена большая группа цитокинов (IL-2, -3, -4, -10, IFN- α), при действии которых запускается эндогенная программа защиты клеток от апоптоза, опосредованная через белки Vcl-2, Vcl-x_L и др. [Белушкина Н.Н., 2001; Потапнев М.П., 2002]. Тем не менее ряд других цитокинов (IFN- γ , TNF, β -токоферол, IL-1, -10) обладает способностью индуцировать апоптоз [Фильченков А.А., Стойка Р.С., 1995; Уманский С.Р., 1996]. Эффект некоторых цитокинов (например, IFN- γ , IL-10) может быть разнонаправленным и зависеть как от типа клеток, так и от их функционального состояния [Новиков В.С., 1996; Ярилин А.А., 1998]. Поэтому для нас представляла интерес реакция взятых у пациентов с хронической вирусной персистенцией лимфоцитарных клеток на лишение факторов роста. Инкубирование лимфоцитов в бессывороточной культуральной среде в течение 18 ч приводило к тому, что уровень апоптоза изучаемых клеток варьировал от 75 до 96% (рис. 2). Полученные данные свидетельствуют о том, что лимфоциты на фоне длительной персистенции вирусов являются чрезвычайно чувствительными к проапоптотическим стимулам. Эта чувствительность, вероятно, связана со способностью вирусов модулировать апоптотическую программу. Подобное вмешательство в регуляцию апоптотической гибели, по-видимому, отражается на функциональной состоятельности иммунокомпетентных клеток, обуславливая иммунологическую недостаточность. С другой стороны, усиление реализации апоптотической гибели зрелых лимфоцитарных клеток может быть вызвано активацией последних в ответ на вирусную интервенцию.

Не менее важная роль в регуляции апоптоза отводится гормонам, в частности глюкокортикоидам. Известно, что чувствительность к проапоптотическому действию глюкокортикоидов лимфоидных клеток зависит от стадии развития. Пре-Т-клетки и пре-В-клетки, незрелые Т-клетки тимуса, определенные субпопуляции зрелых лимфоцитов (NK-клетки, СТЛ), а также незрелые В-лимфоциты претерпевают апоптоз под действием физиологических доз глюкокортикоидов. Зрелые Т- и В-лимфоциты нечувствительны к глюкокортикоидам [Ярилин А.А., 1996].

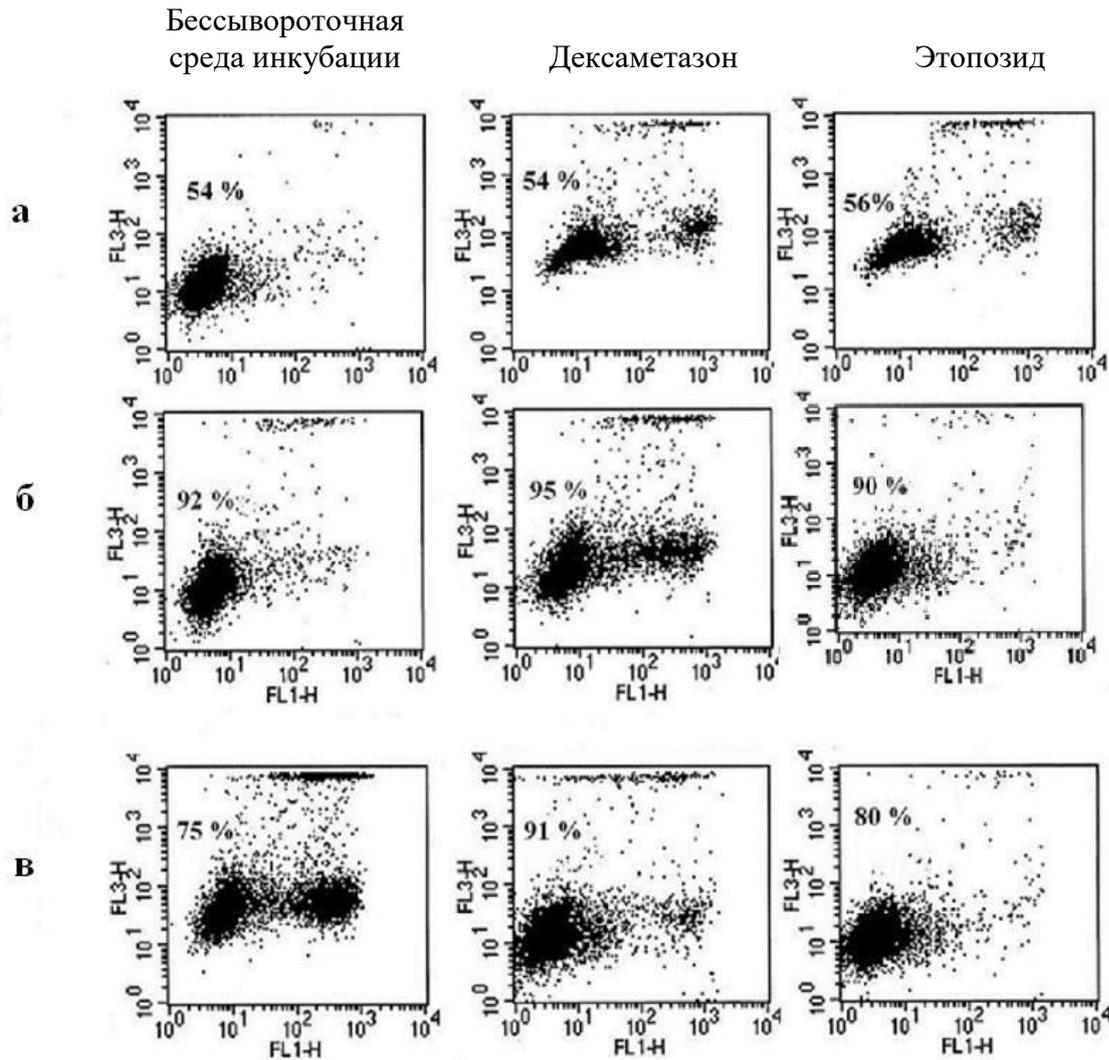


Рис. 2. Одномерная гистограмма, отражающая уровень апоптоза лимфоцитарных клеток периферической крови, культивированных в присутствии модуляторов апоптоза: а – у здоровых доноров; б – у больных хроническим гепатитом В; в – у пациентов с клещевой нейроинфекцией (по данным проточно-цитометрического анализа)

Проведенное нами исследование показало, что при вирусной персистенции наблюдается изменение чувствительности зрелых лимфоцитов к проапоптотическому влиянию стероидных гормонов. Так, при инкубировании лимфоцитов, полученных у пациентов с длительной персистенцией вирусов гепатита В, С и клещевого энцефалита, в полной культуральной среде с добавлением синтетического стероида дексаметазона отмечалось значительное обогащение лимфоцитарной популяции апоптотическими клетками (рис. 2). Подобная реакция иммунных клеток, вероятно, объясняется тем, что при персистировании вирусов происходит активация лимфоцитов, что делает их чувствительными к индукции апоптоза внешними стимулами, в том числе и глюкокортикоидами. Кроме того, вирусы могут снижать продукцию различных цитокинов, в том числе ИЛ-2, ИЛ-3 и ИЛ-5, которые являются физиологическими антагонистами апоптоз-индуцирующего действия кортикостероидов [Потапнев

М.П., 2002]. Указанные изменения приводят к изменению функционального состояния лимфоцитов и дефекту иммунных реакций.

Наконец, индукция апоптоза может реализоваться вследствие возникновения источника сигнала внутри самой клетки. Такая ситуация может сложиться в условиях накопления нерепарированных разрывов ДНК в результате нарушения процессов репарации [Тронов Е.А., Константинов Е.М., 2000; Рязанцева Н.В. и соавт., 2003]. Одним из ферментов репарации ДНК является топоизомераза II. Этот белок участвует в формировании структур ДНК высшего порядка – суперспирализованных петель. При блокировании топоизомеразы II нарушаются процессы репарации повреждённых участков ДНК, происходит остановка митоза на стадии G_2 , что приводит к запуску апоптотических реакций.

Цитостатик этопозид является ингибитором топоизомеразы II. При этом происходит накопление белка p53, что приводит к задержке клеточного цикла [Lowe S.W. et al., 1993]. Блок клеточного цикла в фазах G_1 и G_2 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, то в таких клетках индуцируется апоптоз [Белушкина Н.Н. и соавт., 1998]. Кроме того, этопозид прямо активирует каспазу-3, которая является важным участником апоптотического каскада [Ekert P.G., 1999; Ли С.-Х. и соавт., 2002; Clifford V. et al., 2003].

При добавлении этопозиды в культуральную среду с последующей инкубацией в ней лимфоцитов крови, полученных у пациентов с хронической вирусной персистенцией, нами отмечалось увеличение численности лимфоцитарных клеток, находящихся на ранних стадиях реализации программы гибели клетки (рис. 2). Это может быть связано с тем, что вирусы способны вызывать нарушение функциональной активности систем контроля и поддержания генетического гомеостаза, в том числе и системы репарации, на клеточном и молекулярном уровне, что обуславливает риск возникновения хромосомных aberrаций [Кояма А.Н., 1995; Новицкий В.В. и соавт., 2003; Рязанцева Н.В. и соавт., 2004]. Накопление нерепарируемых повреждений ДНК приводит к гибели клетки в результате нарушения функционирования регуляторных внутриклеточных систем из-за невозможности полноценной транскрипции генов, содержащих дефекты в матрице [Giannelli F., 1986].

Таким образом, применение различных модуляторов апоптоза позволило выявить однонаправленные изменения апоптотической реакции лимфоцитов на фоне длительной персистенции вирусных агентов различной таксономической принадлежности, проявляющиеся в повышении чувствительности лимфоцитарных клеток к разнообразным проапоптотическим стимулам и, вероятно, снижении их функционального потенциала.

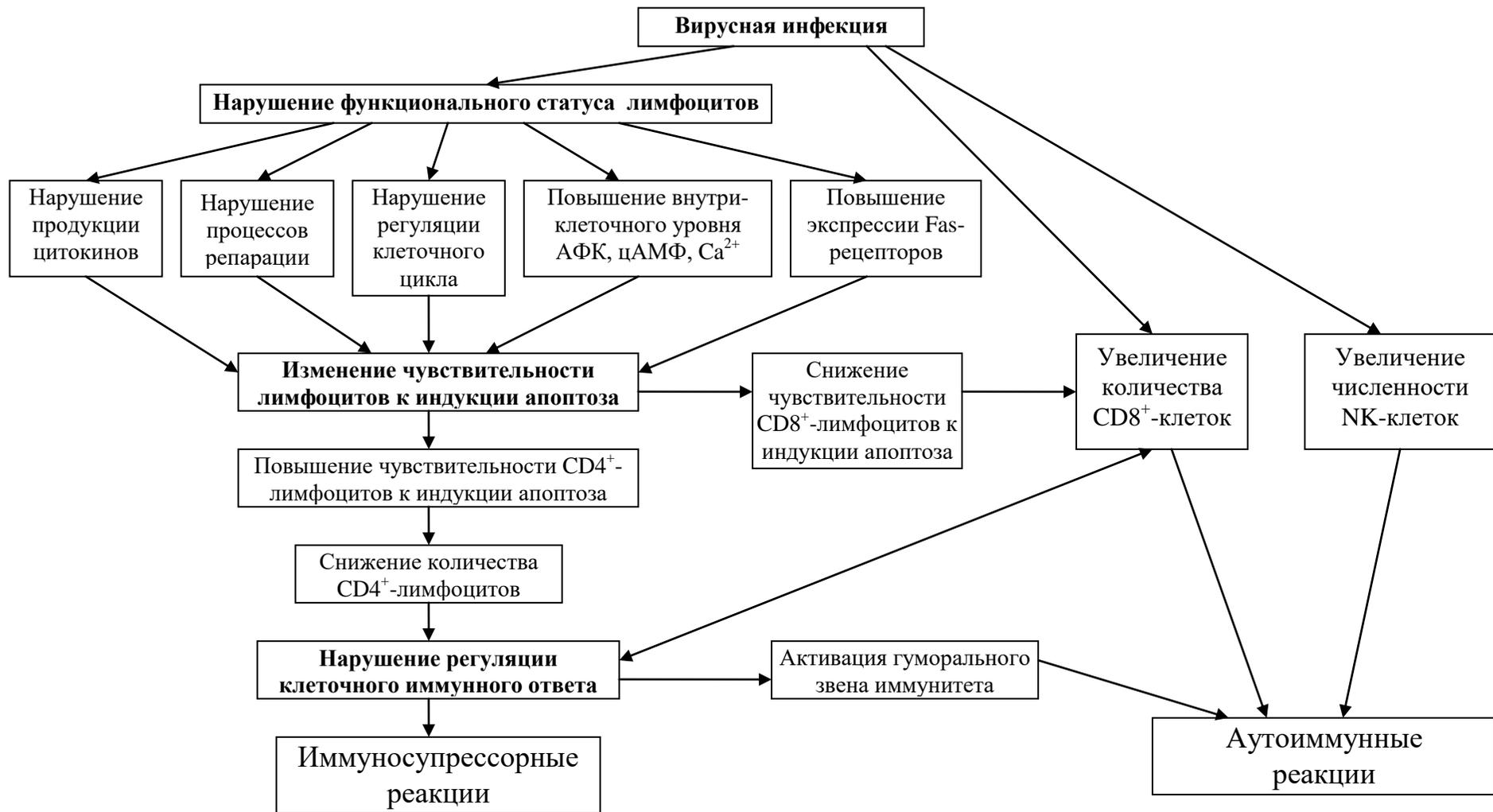


Рис. 3. Роль апоптоза лимфоцитов в регуляции иммунного ответа при длительной вирусной персистенции

Подводя итог, следует отметить, что вирусное воздействие на ход апоптоза неоднозначно (рис. 3). При вирусной инфекции апоптоз является результатом как прямого, так и опосредованного иммунной реакцией воздействия инфекта. Многие вирусы, в том числе возбудители гепатита В и С, а также клещевого энцефалита, способны модулировать программу гибели клетки в соответствии со своей стратегией выживания, обуславливая тем самым развитие иммунопатологических реакций.

Безусловно, в нашей работе мы смогли осветить лишь некоторые вопросы, касающиеся механизмов формирования длительной вирусной персистенции. Одним из центральных звеньев патогенеза хронических вирусных инфекций, вызванных возбудителями гепатита В и С, а также клещевого энцефалита, является дисрегуляция иммунных реакций, что обуславливает длительную циркуляцию вирусов в макроорганизме. Участие нарушений регуляции апоптоза лимфоцитов в генезе иммунологической недостаточности при хронизации инфекционного процесса, на наш взгляд, не вызывает сомнения. Дальнейшее изучение данной проблемы должно быть сконцентрировано на всестороннем исследовании молекулярных механизмов дисрегуляции апоптотической программы лимфоцитарных клеток.

ВЫВОДЫ

1. Нарушение реализации запрограммированной гибели лимфоцитов является одним из звеньев иммунопатогенеза персистентных вирусных инфекций.
2. Дисбаланс Т-клеточного звена иммунитета при персистентных вирусных инфекциях сопряжен с ингибированием апоптоза лимфоцитов у пациентов с хроническим вирусным гепатитом В и С, усилением апоптотической реакции – у пациентов с длительной антигемией вируса клещевого энцефалита.
3. При персистентных вирусных инфекциях дискоординировано вовлечение в спонтанный и активационный апоптоз CD4⁺- и CD8⁺-лимфоцитов с преобладанием запрограммированной гибели регуляторных клеток.
4. Чувствительность лимфоцитов, полученных от пациентов с хроническим гепатитом В, С и длительной антигемией вируса клещевого энцефалита, к действию модуляторов апоптоза (бессывороточная среда, инкубации, дексаметазон, этопозид) *in vitro* повышена по сравнению с нормой, что свидетельствует о снижении функционального потенциала указанных клеток при длительной вирусной персистенции.
5. Изменение чувствительности лимфоцитов к индукции апоптоза при персистентных вирусных инфекциях сопряжено с нарушением апоптотической реакции регуляторных и эффекторных клеток, что определяет характер иммунологических расстройств.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Хронический гепатит В: структура, метаболизм и цитогенетические особенности // Экспериментальна і клінічна медицина. – 2003. - №2. – С. 64-67 (в соавт. с Новицким В.В., Рязанцевой Н.В., Наследниковой И.О., Токаревой Н.В., Жуковой О.Б., Антошиной М.А., Белоконь В.В., Миноченко Ю.В., Томсон Ю.В., Комаровой Т.С., Чернецкой Н.Н.).

2. 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., Жуковой О.Б., Новицким В.В., Ткаченко С.Б., Михеевым С.Л., Литваком М.М., Токаревой Н.В.).
3. 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., Жуковой О.Б., Белобородовой Э.И., Новицким В.В., Ткаченко С.Б., Белобородовой Е.В., Токаревой Н.В., Михеевым С.Л.).
4. Апоптоз лимфоцитов крови у пациентов с хронической персистенцией вирусов // Межгородская конференция молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии», г. Санкт-Петербург, 15-16 апреля, 2004 г. – СПб, 2004. – С. 27-29 (в соавт. с Жуковой О.Б., Литваком М.М., Михеевым С.Л., Наследниковой И.О., Мельниковой А.П., Антошиной М.А., Ермолаевой Е.С., Хлаповым А.П., Пигузовой Е.А.).
5. 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 Жуковой О.Б., Рязанцевой Н.В., Новицким В.В., Михеевым С.Л., Мельниковой А.П., Наследниковой И.О., Литваком М.М., Ермолаевой Е.С., Токаревой Н.В.)
6. Проточная цитометрия – современный метод изучения апоптоза иммунокомпетентных клеток крови // Материалы V Международного конгресса молодых ученых и специалистов «Науки о человеке», г. Томск, 20-21 мая 2004 г. – Томск, 2004. – С. 98 (в соавт. с Жуковой О.Б., Мельниковой А.П., Наследниковой И.О., Михеевым С.Л., Литваком М.М., Пигузовой Е.А.).
7. 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 окт. 2004 г.– Новосибирск, 2004. – С.86-87 (в соавт. с Жуковой О.Б., 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.).
8. Апоптотическая гибель CD4⁺-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 Жуковой О.Б., Рязанцевой Н.В., Новицким В.В., Радзивил Т.Т., Белобородовой Е.В., Литваком М.М., Михеевым С.Л., Зима А.П.).
9. Нарушение программы гибели лимфоцитов крови при длительной вирусной персистенции // Материалы VI Международного конгресса молодых ученых и специалистов «Науки о человеке», г. Томск, 20-21 мая 2005 г. – Томск, 2005. – С. 28 (в соавт. с Жуковой О.Б., , Михеевым С.Л., Литваком М.М., Килиной О.В., Бутаковым А.А., Елмановой И.В.).
10. 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., Жуковой О.Б., Рязанцевой Н.В., Новицким В.В., Радзивил Т.Т., Белобородовой Е.В., Михеевым С.Л., Зима А.П.).
11. 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., Жуковой О.Б., Рязанцевой Н.В., Новицким В.В., Михеевым С.Л., Зима А.П., Литвиновой Л.С., Радзивил Т.Т., Пигузовой Е.А.).
 12. Модуляция апоптоза лимфоцитов крови как способ выживания вируса гепатита С // Иммунология. – 2005. – Т.26, №2. – С. 79-83 (в соавт. с Жуковой О.Б., Рязанцевой Н.В., Новицким В.В., Никоновой М.Ф., Радзивил Т.Т.).
 13. 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., Жуковой О.Б., Литваком М.М., Михеевым С.Л.).
 14. 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 Жуковой О.Б., Рязанцевой Н.В., Зима А.П., Новицким В.В., Радзивил Т.Т., Литваком М.М., Михеевым С.Л., Мороз Е.А., Литвиновой Л.С., Колобовниковой Ю.В.).
 15. Вирусиндуцированная модуляция программы апоптотической гибели клетки // Бюллетень сибирской медицины. – 2005. – № 4. – С. 78-83 (в соавт. с Жуковой О.Б., Рязанцевой Н.В., Новицким В.В., Михеевым С.Л., Литваком М.М.).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АФК – активные формы кислорода
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ИГА – индекс гистологической активности
ИФА – иммуноферментный анализ
КЭ – клещевой энцефалит
ПЦР – полимеразная цепная реакция
РНГА – реакция непрямой гемагглютинации
РНК – рибонуклеиновая кислота
ФГА – фитогемагглютинин
ФИТЦ – флюоресцеинизотиоцианат
CD – кластер дифференцировки
CTL – цитотоксический Т-лимфоцит
HBV – вирус гепатита В
HCV – вирус гепатита С
IFN – интерферон
Ig – иммуноглобулин
IL – интерлейкин
MHC – главный комплекс гистосовместимости
NK – натуральный киллер
NS – неструктурный белок
Th – Т-хелпер
TNF – фактор некроза опухоли