

МОДУЛЯЦИЯ ПРОГРАММИРУЕМОЙ ГИБЕЛИ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

© О. Б. Жукова,¹ Н. В. Рязанцева, В. В. Новицкий, Т. Т. Радзивил,
Л. С. Литвинова, Н. Ю. Часовских

Кафедра фундаментальных основ клинической медицины и

кафедра патофизиологии ГОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет Росздрава», Томск;

¹ *электронный адрес: snil@mail.ru*

Проведено исследование программируемой гибели лимфоцитов при хронической инфекции, вызванной вирусами клещевого энцефалита, гепатитов В и С. Показано, что характер нарушений реализации апоптоза лимфоцитарных клеток определяется молекулярными особенностями возбудителя. При инкубации *in vitro* лимфоцитов с дексаметазоном, этопозидом и в бессывороточной среде гибель клеток по механизму апоптоза усиливается. Основным модуляционным изменениям при вирусной персистенции подвергаются рецепторный и митохондриальный пути проведения апоптогенного сигнала.

Ключевые слова: лимфоцит, хроническая вирусная инфекция, апоптоз, модуляция, Fas-рецептор, TNF-рецептор, мембранный потенциал митохондрий.

Принятые сокращения: КЭ — клещевой энцефалит, HBV — вирус гепатита В, HCV — вирус гепатита С, ФГА — фитогемагглютинин, МКАТ — моноклональные антитела, TNF — фактор некроза опухоли, Fas-L — Fas-лиганд, Δψ — мембранный потенциал митохондрий.

Возрастающая частота хронизация инфекционного процесса, а также возможность развития опасных осложнений, вызванных реализацией онкогенного потенциала вирусов, обуславливают актуальность постановки вопросов, касающихся молекулярно-биологических аспектов формирования вирусной персистенции. Хронические вирусные инфекции представляют собой интересный биологический феномен длительного (иногда пожизненного) персистирования чужеродного генетического объекта в зараженной клетке. Представители большинства таксономических групп вирусов могут служить причиной развития патологических процессов, при которых репликация вирусов обеспечивается жизнеспособностью клетки-хозяина. Несмотря на получение новых данных фундаментального характера о механизмах формирования вирусной персистенции, неразрешенным остается вопрос о причинах, приводящих при разных возбудителях к одному исходу болезни — формированию хронического инфекционного процесса (Dbaibo, Hannun, 1998; Жукова и др., 2003; Наследникова и др., 2005).

В современной литературе обсуждается спектр возможных механизмов, посредством которых вирусы способны оказывать воздействие на иммунную систему. Один из них — модулирование программируемой гибели иммунокомпетентных клеток. Апоптоз представляет собой процесс физиологической клеточной смерти, при котором происходит изменения во всех структурах клетки: в ядре (межнуклеосомная фрагментация ДНК, конденсация хроматина, кариорексис с последующим образованием апоптотических телец), цитоплазме (расширение эндоплазматического ретикулума, конденсация и

сморщивание гранул, снижение трансмембранного потенциала митохондрий и др.), плазматической мембране (повышение проницаемости для небольших молекул, например пропидиум иодида, утрата «ворсинчатости» и образование пузырьвидных вздутий, экспрессия на поверхности не обнаруживаемых в норме молекул фосфатидилсерина и др.) (Самуилов и др., 2000; Ярилин, 2001; Kountouras et al., 2003). Роль апоптоза значима в уравновешивании эффекта клеточной пролиферации, дифференцировки, а также в элиминации функционально не полноценных иммунокомпетентных клеток (Никонова и др., 1999; Хаитов, 2001; Ярилин, 2001; Барышников, Шишкин, 2002; Потапнев, 2002).

При вирусной интервенции активируются защитные силы организма, биологической ролью которых является элиминация вируса и зараженных им клеток. Участие апоптоза в удалении вирусосодержащих клеток имеет важное биологическое значение, поскольку фрагментация ДНК предупреждает перенос генетического материала в другие интактные клетки. Показано, что при вирусных инфекциях сосуществуют факторы, индуцирующие и ингибирующие программируемую клеточную смерть (Dbai-bo, Hannun, 1998; Ehrmann et al., 2000; Ahn et al., 2002; Нау, Kannourakis, 2002; Жукова и др., 2005; Новицкий и др., 2005; Рязанцева и др., 2005б; Чечина и др., 2005). В интересах вируса — подавить апоптоз и сохранить жизнеспособность клетки. Таким образом, исход инфекционного процесса связывают с результатом противостояния антиапоптотической способности вирусов и активации физиологической гибели инфицированной клетки как части защитного механизма организма.

Понять, какую роль несет в себе индукция или угнетение программируемой клеточной гибели в условиях прогрессирования персистентной вирусной инфекции, можно опираясь на знания молекулярных механизмов регуляции апоптоза иммунокомпетентных клеток, что и стало целью настоящего исследования.

Материал и методика

Результаты проведенного исследования основаны на данных анализа различных параметров апоптоза лимфоцитов периферической крови, полученных от 19 здоровых доноров и 95 пациентов с хронической инфекцией, вызванной вирусами клещевого энцефалита (КЭ), гепатитов В и С. Верификацию диагноза КЭ проводили путем сбора эпидемиологического анамнеза, оценки неврологического статуса, определения уровня специфических антител к антигену вируса методами непрямого реакции гемагглютинации и иммуноферментного анализа, обнаружения вирусной РНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Диагноз вирусного гепатита основывался на наличии в крови ДНК вируса гепатита В (HBV), РНК вируса гепатита С (HCV) (метод ПЦР), серологических маркеров HBV (Hbe-антиген, HBs-антиген, анти-Hbcor IgM, анти-Hbcor суммарные) и HCV (анти-HCV Ig к core, С-протеину, неструктурным белкам NS-3, NS-4, NS-5, анти-HCV IgM), а также клинико-лабораторных синдромов холестаза, цитолиза, мезенхимально-воспалительного синдрома, результатах ультразвукового и скинтиграфического исследований печени. Активность процесса устанавливалась на основании данных морфологического анализа биоптатов печени. Критериями исключения пациентов являлись алкогольная и наркотическая зависимость, а также воспалительные процессы инфекционной и неинфекционной этиологии. Все пациенты были обследованы до начала проведения лечения. Материалом исследования являлась венозная кровь обследованных лиц, взятая утром до приема пищи и стабилизированная гепарином (25 Ед/мл). Объектом исследования служили лимфоциты, выделенные из крови путем центрифугирования на слое Ficoll-Paque (Pharmacia, Швеция) плотностью 1.077.

Регистрацию апоптоза лимфоцитов проводили методом, основанным на определении экспрессии фосфатидилсерина с помощью аннексина V, конъюгированного с FITC (Caltag, США) (Van Engeland et al., 1998). Лимфоциты периферической крови ($2 \cdot 10^5$ в лунке) культивировали в полной культуральной среде без митогена или с добавлением 10 мкг/мл фитогемагглютинина (ФГА) (Difco BD) в течение 18 ч при 37 °С и 5 % CO₂. Для изучения чувствительности лимфоцитарных клеток к индукторам апоптоза в отдельные пробы либо добавляли 10⁻⁴ моль/мл синтетического глюкокортикоида дексаметазона (KRCA, Словения) или 10⁻⁶ моль/мл ингибитора топоизомеразы II этопозид (Rhone-Poulenc Roger, Франция), либо проводили культивирование лимфоцитов в бессывороточной среде. После отмывания клетки (10⁶ в 1 мл) окрашивали в аннексиновом буфере (Caltag, США), содержащем аннексин V — FITC. Через 10 мин их подвешивали в проточной цитофлуориметрии на цитометре Ericcs XL (Beckman Coulter, Франция). Анализировали параметры зеленой (FITC — 530 нм) флуоресценции в гейте лимфоцитарных клеток, выявляемых по показателям малоуглового (FSC) и бокового (SSC) светорассея-

ний, характеризующих размер и гранулярность клетки соответственно.

Содержание лимфоцитов, несущих маркер апоптотической предрасположенности Fas-рецептор (FasR), оценивали иммуноцитохимическим методом (Тотолян и др., 2002) с использованием набора реагентов Novocastra (Великобритания). Для выявления специфических антигенов на поверхностной мембране клеток к суспензии выделенных лимфоцитов добавляли раствор моноклональных антител (МКАТ) мыши, специфичных к CD95-рецепторам, и инкубировали 60 мин. Затем препараты трижды отмывали фосфатным буфером (рН 7.4), после чего 30 мин инкубировали с биотинилированными связывающими антителами. После трехкратного отмывания фосфатным буфером на препарат на 10 мин наносили стрептавидин, конъюгированный с щелочной фосфатазой, и повторяли отмывание. Затем образцы инкубировали с холодным хромоген-субстратом Fast Red в течение 10 мин. Хромоген смывали дистиллированной водой и препараты докрашивали гематоксилином (Sigma, США). Учет результатов проводили в световом микроскопе с использованием масляной иммерсии, подсчитывая на 200 лимфоцитов долю (в %) положительно окрашенных клеток.

Для определения уровня экспрессии рецептора к фактору некроза опухоли α 1-го типа (TNFR1) использовали цитофлуориметрический метод, основанный на взаимодействии соответствующих МКАТ с мембранным рецептором к TNF α на лимфоцитах. После культивирования клетки отмывали фосфатно-солевым буфером (рН 7.2) и окрашивали стандартными МКАТ к рецептору (TNFR1), мечеными FITC (Immunotech, Франция) согласно протоколу фирмы производителя. После 30 мин инкубации анализировали содержание лимфоцитов, флуоресцирующих на FL1-канале (530 нм) проточного цитофлуориметра.

Уровень мембранного потенциала митохондрий клеток определяли с использованием набора реагентов MitoScreen (BD Pharmingen, США). В чистую полистириновую пробирку переносили 1 мл суспензии мононуклеарных лейкоцитов, содержащих 10⁶ клеток, и центрифугировали при 400 g 5 мин при комнатной температуре. К клеточному осадку добавляли 0.5 мл свежеприготовленного (согласно инструкции производителя) раствора JC-1. Клетки ресуспендировали и инкубировали 10—15 мин при 37 °С. Затем клетки дважды отмывали буфером. Известно, что флуорохром JC-1 способен существовать в двух различных состояниях — агрегатах и мономерах. JC-1-мономер быстро проникает через митохондриальную мембрану живой клетки, в результате чего внутри митохондрии формируются JC-1-агрегаты, характеризующиеся красным спектральным свечением ($\lambda = 590$ нм), которое может быть измерено на FL-2-канале проточного цитометра. При деполяризации митохондриальной мембраны, являющейся ранним признаком апоптоза, JC-1 не накапливается внутри митохондрии и находится в цитоплазме в виде мономерной формы, которая характеризуется зеленым спектральным свечением ($\lambda = 525$ нм), что измеряется на FL-1-канале. В окрашенных JC-1 образцах определяли процентное содержание лимфоцитов в гейтах неапоптотических (FL-2- и FL-1-свечение) и апоптотических (FL-1-свечение) клеток.

Полученные данные обрабатывали методами вариационной статистики. Достоверность различий средних

величин оценивали с помощью непараметрических критериев Манна—Уитни (для независимых выборок) и Вилкоксона (для зависимых выборок). Различия считались достоверными при уровне значимости $P < 0.05$.

Результаты и обсуждение

В результате оценки реализации программируемой клеточной гибели в аннексиновом тесте были установлены изменения апоптотической реакции лимфоцитарных клеток у лиц с длительной персистенцией вирусов. Так, уровень спонтанного апоптоза лимфоцитов при хроническом гепатите В не отличался от аналогичного показателя у здоровых доноров (табл. 1). При персистенции возбудителя гепатита С было зарегистрировано достоверное снижение содержания апоптотических клеток, что, по-видимому, явилось результатом нарушения естественной реализации программируемой клеточной гибели. Обнаружено, что длительное пребывание вируса клещевого энцефалита (КЭ) в организме сопровождается повышенной долей лимфоцитарных клеток, вступивших в спонтанный апоптоз (табл. 1). Чрезмерная гибель клеток, осуществляющих реализацию противовирусного иммунитета, обуславливает неадекватность иммунного ответа и формирование хронического течения патологического процесса (Ярилин, 2001).

Поскольку форма реакции клетки в ответ на антигенную стимуляцию определяет результативность иммунного ответа, наиболее значимой является оценка активационного апоптоза (Никонова и др., 1999). Проведенное нами исследование показало, что уровень апоптоза лимфоцитов, активированных митогеном ФГА, у пациентов с хроническим гепатитом В и КЭ значительно превосходил средние значения аналогичного параметра у здоровых лиц (табл. 1). Подобная реакция может быть связана с повышенной чувствительностью лимфоцитарных кле-

ток к апоптогенным факторам в условиях вирусной инфекции. Показано, что НВх-белок вируса гепатита В индуцирует апоптоз чувствительных клеток (Chang et al., 2003). Кроме этого, прямым агентом, запускающим Fas-опосредованную гибель, является НВs-антиген (Tanaka et al., 1998). По данным Эрманн и соавторов (Ehrtmann et al., 2000), у НВs-антиген-положительных лиц повышена экспрессия проапоптотического белка Вах в гепатоцитах и лимфоцитах. При хроническом гепатите С отмечались иные изменения (табл. 1). Уменьшение количества лимфоцитов, вступивших в активационный апоптоз, у пациентов с гепатитом С, по-видимому, свидетельствует о способности данного возбудителя угнетать реализацию программы гибели клетки. Например, антиапоптотическая стратегия вируса гепатита С сводится к подавлению функции белка Р53, инактивации каспаз, а также к усилению экспрессии ингибитора апоптоза Bcl-X_L (Otsuka et al., 2002; Kountouras et al., 2003). Таким образом, на фоне хронической вирусной инфекции апоптотическая реакция иммунокомпетентных клеток претерпевает изменения, направленность которых определяется молекулярными особенностями возбудителя.

Важным результатом взаимодействия регуляторных факторов с про- и антиапоптотической активностью является способность организма адекватно модулировать процесс гибели своих клеток в неблагоприятных условиях. После инкубации лимфоцитов крови *in vitro* в условиях воздействия различных модуляторов апоптоза (дексаметазон, этопозид, лишение ростовых факторов) характер апоптотической реакции лимфоцитарных клеток претерпевал выраженные изменения. Культивирование лимфоцитов в бессывороточной питательной среде, лишенной ростовых факторов, индуцировало гибель более половины числа клеток у здоровых доноров и более 75 % лимфоцитарных клеток, полученных от пациентов с длительной вирусной персистенцией (табл. 1). Известно, что дефицит факторов роста воспринимается клеткой

Таблица 1

Содержание апоптотических лимфоцитов периферической крови у пациентов с хроническими вирусными инфекциями в условиях культивирования *in vitro* с модуляторами апоптоза

Исследуемый параметр лимфоцитов	Доля лимфоцитов, %, $\bar{x} \pm s_x$			
	здоровые доноры	пациенты с хроническими инфекциями, вызванными вирусами ^a		
		гепатита В	гепатита С	клещевого энцефалита
Спонтанный апоптоз	11.23 ± 1.02	8.89 ± 1.65 ($P > 0.05$)	6.32 ± 1.43 ($P < 0.05$)	21.83 ± 1.67 ($P < 0.001$)
Модуляция апоптоза <i>in vitro</i> добавлением ФГА	9.14 ± 1.30	16.75 ± 2.99 ($P < 0.05$)	5.54 ± 0.87 ($P < 0.05$)	18.54 ± 2.87 ($P < 0.01$)
лишением ростовых факторов	54.04 ± 4.31	92.50 ± 5.40 ($P < 0.001$)	90.19 ± 1.53 ($P < 0.001$)	75.00 ± 2.37 ($P < 0.01$)
добавлением дексаметазона	53.82 ± 3.47	95.15 ± 4.85 ($P < 0.001$)	83.30 ± 3.82 ($P < 0.001$)	91.06 ± 1.81 ($P < 0.001$)
добавлением этопозида	55.94 ± 4.33	90.35 ± 1.34 ($P < 0.001$)	89.83 ± 1.07 ($P < 0.001$)	80.43 ± 3.11 ($P < 0.001$)

^a P — достоверность различий по сравнению с аналогичными показателями у здоровых доноров.

Таблица 2

Показатели рецепторного и митохондриального путей апоптоза лимфоцитов периферической крови при хронических вирусных инфекциях ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Исследуемый параметр	Здоровые доноры	Пациенты с хроническими инфекциями, вызванными вирусами ^а		
		гепатита В	гепатита С	клещевого энцефалита
Содержание Fas ⁺ -лимфоцитов, %	10.83 ± 1.13	10.84 ± 1.14 (<i>P</i> > 0.05)	16.40 ± 1.72 (<i>P</i> < 0.05)	14.43 ± 1.35 (<i>P</i> < 0.05)
Содержание TNFRI ⁺ -лимфоцитов, %	2.58 ± 0.21	8.61 ± 1.15 (<i>P</i> < 0.05)	3.73 ± 0.54 (<i>P</i> > 0.05)	13.58 ± 2.82 (<i>P</i> < 0.001)
Содержание лимфоцитов со сниженным уровнем Δψ ^б , %	5.09 ± 0.84	3.89 ± 0.90 (<i>P</i> > 0.05)	5.05 ± 0.18 (<i>P</i> > 0.05)	34.45 ± 4.01 (<i>P</i> < 0.001)

^а *P* — достоверность различий по сравнению с аналогичными показателями у здоровых доноров. ^б Δψ — мембранный потенциал митохондрий.

как сигнал к апоптозу: происходят дефосфорилирование проапоптотического белка Bad, внедрение его в наружную мембрану митохондрий, высвобождение цитохрома *c* и последующая активация каспазы-9 (Takamatsu et al., 2001).

Значимая роль в регуляции апоптоза отводится гормонам, в частности глюкокортикоидам. Известно, что зрелые лимфоциты нечувствительны к действию глюкокортикоидов (Хаитов, 2001; Ярилин и др., 2001). Полученные *in vitro* результаты демонстрируют повышенную чувствительность зрелых лимфоцитов к проапоптотическому влиянию синтетического гормона дексаметазона, наиболее выраженную при вирусной персистенции (табл. 1). Действие глюкокортикоидов опосредовано специфическими внутриклеточными рецепторами, которые регулируют экспрессию большого количества генов, активизируя или подавляя генную транскрипцию. К тому же апоптотическая гибель клеток, опосредованная действием глюкокортикоидов, возможно, реализуется через митохондриальный путь в условиях снижения трансмембранного потенциала, поступления цитохрома *c* в цитозоль и активации каспазы-9 (Wuchter et al., 2002).

Индукция апоптоза может реализоваться вследствие возникновения источника сигнала внутри самой клетки. Такая ситуация складывается при накоплении нерепарированных разрывов ДНК в результате снижения активности системы репарации, что было показано нами ранее (Рязанцева и др., 2002, 2003, 2004; Новицкий и др., 2003). Одним из ферментов репарации ДНК является топоизомераза II. Этот белок участвует в формировании структур ДНК высшего порядка — суперспирализованных петель (Clifford et al., 2003). При добавлении в культуральную среду цитостатического препарата этопозида, обладающего ингибирующей активностью в отношении топоизомеразы II, с последующей инкубацией в ней лимфоцитов крови здоровых лиц и пациентов с хронической вирусной персистенцией нами отмечалось увеличение численности лимфоцитарных клеток, находящихся на ранних стадиях реализации программы гибели клетки (табл. 1). При блокировании топоизомеразы II нарушаются процессы репарации поврежденных участков ДНК, происходит остановка митоза на стадии G₂, что приводит к запуску апоптотических реакций в результате невоз-

можности полноценной транскрипции генов, содержащих дефекты в матрице (Clifford et al., 2003).

Решающую роль в регуляции иммунного ответа играет процесс программированной клеточной смерти, запускаемый через так называемые смертельные рецепторы. Они представляют собой трансмембранные гликопротеиды, которые, взаимодействуя со специфическими лигандами, передают апоптотический сигнал в клетку и вызывают активацию каспаз. В большинстве «смертельные рецепторы» относятся к семейству рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR) и характеризуются сходными экстрацеллюлярными доменами, богатыми цистеином. Рецепторы смерти также имеют в своей структуре гомологичные цитоплазматические участки, называемые «доменами смерти», которые принимают непосредственное участие в запуске апоптоза (Фильченков и др., 2002). Наиболее изученными из «смертельных рецепторов» являются Fas (CD95 или Apo1) и TNFR 1 (CD120a или P55) (Барышников, Шишкин, 2002). Fas способен запускать в клетке апоптоз при взаимодействии с Fas-лигандом (Fas-L). Fas-L впервые был выделен из мембранной фракции клеток цитотоксической Т-клеточной гибридомы, способной вызывать гибель Fas-экспрессирующих клеток (Suda, Nagata, 1994). По аминокислотной последовательности Fas-L гомологичен TNF-цитокину, давшему название семейству подобных белков. Как и другие члены семейства TNF, Fas-L проявляет свою активность в форме гомотримера. В случае активации Fas-рецептора его тримерный цитоплазматический домен приобретает способность к дальнейшей передаче сигнала на каспазу-8, которая приводит в действие ферментативный каскад активации каспаз (Самуилов и др., 2000).

Изучая уровень апоптотической готовности иммунокомпетентных клеток периферической крови, мы обнаружили повышение содержания TNFRI⁺-лимфоцитов при гепатите В и КЭ по сравнению со средним уровнем данных показателей у здоровых доноров (табл. 2). Как известно, в условиях вирусной инфекции TNF-индуцированная гибель клеток может иметь доминирующее значение ввиду антигенной модуляции секреции данного цитокина, обладающего провоспалительным действием и являющегося ключевым регулятором интенсивности иммунного ответа (Потапнев, 2002). Результаты ра-

нее проведенных исследований свидетельствовали о снижении способности мононуклеарных лейкоцитов больных хроническими вирусными инфекциями секретировать TNF- α (Новицкий и др., 2005; Рязанцева и др., 2005а).

Наряду с этим было выявлено увеличение количества лимфоцитов, несущих Fas-рецептор, у пациентов с длительной персистенцией вируса гепатита С и КЭ (табл. 2). Очевидно, что хроническое течение вирусных заболеваний сопровождается нарушением регуляции рецепторзависимого апоптоза иммунокомпетентных клеток. Одними из механизмов изменения чувствительности лимфоцитов к Fas-индуцированному апоптозу на фоне вирусной инфекции являются дисбаланс между уровнями экспрессии мембранной и растворимой форм Fas-рецептора и Fas-L, а также дизрегуляция процессов, возникающих после активации данного рецептора (Фильченков и др., 2002).

В реализации процесса программируемой клеточной гибели ключевую роль играют митохондрии. Они служат мишенью для специализированных про- и антиапоптотических белков семейства Bcl-2, некоторых транскрипционных факторов и низкомолекулярных медиаторов. Основным ответом митохондрии на действие апоптогенных стимулов является падение величины ее мембранного потенциала, что сопровождается высвобождением из межмембранного пространства широкого спектра биологических активных веществ (цитохрома *c*, индуцирующего апоптоз фактора AIF, прокаспаз-2, -3 и -9), определяющих реализацию гибели клетки (Самуилов и др., 2000; Щепина и др., 2002).

При оценке уровня мембранного потенциала митохондрий ($\Delta\psi$) методом проточной цитометрии было выявлено, что длительная персистенция вируса КЭ характеризовалась увеличением содержания лимфоцитов со сниженным уровнем $\Delta\psi$ (табл. 2), что свидетельствовало об активации митохондриального пути апоптоза при хронической антигенемии вируса КЭ. Вероятно, это вызвано воздействием на митохондрии активных форм кислорода и азота, усиленно нарабатываемых в результате активации свободнорадикальных реакций, сопровождающей течение инфекционного процесса (Маеда, Акаике, 1998). Опосредованная митохондриями реализация программируемой гибели лимфоцитов у пациентов с гепатитами В и С оказалась заблокированной (табл. 2). Показано, что некоторые вирусы обладают способностью модулировать митохондриальный путь апоптоза, изменяя активность белков семейства Bcl-2, контролирующего мембранный потенциал митохондрий. Так, белок E1B-19K аденовируса инактивирует проапоптотические белки Bak, Bcl-2 и Bax, а также ингибирует активацию каспазы-9 и TNF-зависимый путь апоптоза (Нау, Kannourakis, 2002). Сердцевинный протеин вируса гепатита С способен ингибировать апоптоз путем повышения экспрессии Bcl-2_L (Otsu et al., 2002). Вирус Эпштейна—Барр синтезирует аналог Bcl-2, обладающий антиапоптотической активностью (Нау, Kannourakis, 2002).

Таким образом, хроническое течение инфекций, вызванных вирусами КЭ и гепатитов В и С, сопровождается нарушениями реализации программы клеточной гибели лимфоцитов периферической крови, характер которых определяется молекулярными особенностями возбудителя. В результате воздействия различных индукторов независимо от молекулярного механизма их

действия отмечалось увеличение числа лимфоцитарных клеток, вступивших в апоптоз *in vitro*. При этом наиболее выраженные сдвиги проявлялись при исследовании лимфоцитов, полученных у пациентов с хроническими вирусными инфекциями, что, очевидно, свидетельствует о функциональной неполноценности иммунокомпетентных клеток, способствующей поддержанию хронического течения патологического процесса. Основным модуляционным изменениям при вирусной персистенции подвергаются рецепторный и митохондриальный пути проведения апоптогенного сигнала.

Исследование выполнено в рамках Федеральной целевой научно-технической программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники на 2002—2006 годы» (Государственные контракты 02.442.11.7004 и 02.445.11.7110), а также при финансовой поддержке Совета по грантам президента РФ для поддержки ведущих научных школ (НШ-1051.2003.4).

Список литературы

- Барышников А. Ю., Шишкин А. В. 2002. Иммунологические проблемы апоптоза. М.: Эриториал УРПС. 320 с.
- Жукова О. Б., Рязанцева Н. В., Новицкий В. В. 2003. Вирусная персистенция: иммунологические и молекулярно-генетические аспекты патогенеза. Бюл. сибир. мед. 2 (4): 12—17.
- Жукова О. Б., Рязанцева Н. В., Новицкий В. В., Никонова М. Ф., Радзивил Т. Т., Чечина О. Е. 2005. Модуляция апоптоза лимфоцитов крови как способ выживания вируса гепатита С. Иммунология. 26 (2): 79—83.
- Маеда Х., Акаике Т. 1998. Оксид азота и кислородные радикалы при инфекции, воспалении и раке. Биохимия. 63 (7): 1007—1019.
- Наследникова И. О., Рязанцева Н. В., Новицкий В. В., Антошина М. А. 2005. Типовые изменения поверхностной архитектоники лимфоцитов при хронической вирусной инфекции. Цитология. 47 (2): 136—140.
- Никонова М. Ф., Литвина М. М., Варфоломеева М. И., Ярилина А. А., Ярилин А. А. 1999. Апоптоз и пролиферация как альтернативные формы ответа Т-лимфоцитов на стимуляцию. Иммунология. 2: 20—23.
- Новицкий В. В., Жукова О. Б., Рязанцева Н. В., Лепехин А. В., Пирогова Н. П., Михайлова О. В., Плотнова Н. Н., Токарева Н. В., Наследникова И. О., Хлапов А. П. 2003. Цитогенетика лимфоцитов периферической крови при хронической персистенции вируса клещевого энцефалита. Бюл. СО РАМН. 4: 34—37.
- Новицкий В. В., Рязанцева Н. В., Жукова О. Б., Радзивил Т. Т., Белобородова Е. В., Зима А. П., Наследникова И. О., Литвак М. М., Михеев С. Л. 2005. Роль нарушения продукции фактора некроза опухоли альфа мононуклеарами крови в механизмах модуляции апоптоза при гепатите С. Мед. иммунол. 7 (4): 417—420.
- Потаннев М. П. 2002. Апоптоз клеток иммунной системы и его регуляция цитокинами. Иммунология. 4: 237—243.
- Рязанцева Н. В., Жукова О. Б., Белобородова Э. И., Новицкий В. В., Ткаченко С. Б., Белобородова Е. В., Токарева Н. В., Чечина О. Е., Михеев С. Л. 2004. Изменения цитогенетического статуса лимфоцитов периферической крови при хронических HBV- и HCV-инфекциях. Рос. журн. гастроэнтерол. гепатол. колопроктол. 14 (1): 37—40.
- Рязанцева Н. В., Жукова О. Б., Новицкий В. В., Пирогова Н. П., Лепехин А. В., Токарева Н. В. 2002. Структурные и функциональные особенности лимфоцитов у пациентов с хроническим носительством антигена вируса клещевого энцефалита. Бюл. эксперим. биол. мед. 11: 547—550.

Рязанцева Н. В., Жукова О. Б., Новицкий В. В., Ткаченко С. Б., Чечина О. Е., Михеев С. Л., Литвак М. М., Токарева Н. В., Хлапов А. П. 2003. Активность ДНК-репарационной системы лимфоцитов периферической крови у пациентов с хронической вирусной персистенцией. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 13 (6) : 27—29.

Рязанцева Н. В., Наследникова И. О., Зима А. П., Новицкий В. В., Токарева Н. В., Белобородова Е. В., Белоконь В. В., Антошина М. А., Минович Ю. В., Томсон Ю. В. 2005а. Молекулярные механизмы изменения продукции ФНО α мононуклеарами крови при хроническом вирусном гепатите С. Бюл. эксперим. биол. мед. 139 (2) : 191—195.

Рязанцева Н. В., Новицкий В. В., Жукова О. Б., Литвак М. М., Михеев С. Д., Чечина О. Е. 2005б. Вирусиндуцированная дисрегуляция программируемой гибели иммунокомпетентных клеток: адаптация или патология? Успехи физиол. наук. 36 (3) : 33—44.

Самуилов В. Д., Алескин А. В., Лагунова Е. М. 2000. Программированная клеточная гибель. Биохимия. 65 (8) : 1029—1046.

Тоголян А. А., Балдуева И. А., Бубнова Л. Н. 2002. Стандартизация методов иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга человека. Клинич. лаб. диагност. 1 : 44—50.

Фильченков А. А., Степанов Ю. М., Липкин В. М., Кушлинский Н. Е. 2002. Участие системы Fas/Fas-лиганд в регуляции гомеостаза и функционировании клеток иммунной системы. Аллергология и иммунология. 3 (1) : 24—35.

Хаитов Р. М. 2001. Физиология иммунной системы. М.: ВИНТИ РАН. 224 с.

Чечина О. Е., Жукова О. Б., Рязанцева Н. В., Новицкий В. В., Литвак М. М., Михеев С. Л. 2005. Вирусиндуцированная модуляция программы апоптотической гибели клетки. Бюл. сибир. мед. 4 (4) : 78—83.

Щепина Л. А., Попова Е. Н., Плетюшкина О. Ю., Черняк Б. В. 2002. Апоптоз клеток HeLa и антиапоптотное действие онкобелка Bcl-2 не зависят от дыхания и мембранного потенциала митохондрий. Биохимия. 67 (2) : 265—270.

Ярилин А. А. 2001. Апоптоз: природа феномена и его роль в норме и при патологии. В кн.: Актуальные проблемы патофизиологии. М.: Медицина. 13—56.

Ahn J. Y., Jung E. Y., Kwun H. J. 2002. Dual effects of hepatitis B virus X protein on the regulation of cell-cycle control depending on the status of cellular p53. J. Gen. Virol. 83 : 2765—2772.

Chang Z. S., Zeng L. B., Chang C. S., Qing W. W. 2003. Aggregative formation of hepatitis B virus X protein affects cell cycle and apoptosis. World J. Gastroenterol. 9 : 1521—1524.

Clifford B., Beljin M., Stark G. R. et al. 2003. G₂ arrest in response to topoisomerase II inhibitors. The role of p53. Cancer Res. 63 : 4074—4081.

Dbaiho G., Hannun J. 1998. Molecule of the month cytokine response modifier: a strategically deployed viral weapon. Clin. Immunol. Immunopathol. 86 : 134—140.

Ehrmann J., Jr., Galuszkova D., Ehrmann J., Krc I., Jezdinska V., Vojtesek B., Murray P. G., Kolao Z. 2000. Apoptosis-related proteins Bcl-2, Bax, Fas, Fas-L and PCNA in liver biopsies of patients with chronic hepatitis B virus infection. Pathol. Oncol. Res. 6 : 130—135.

Hay S., Kannourakis G. 2002. A time to kill: viral manipulation of the cell death program. J. General Virol. 83 : 1547—1564.

Kountouras J., Zavos C., Chatzopoulos D. 2003. Apoptosis in hepatitis C. J. Virol. Hepatol. 10 : 335—342.

Otsuka M., Kato N., Taniguchi H., Yoshida H., Goto T., Shiratori Y., Omata M. 2002. Hepatitis C virus core protein inhibits apoptosis via enhanced Bcl-xL expression. Virology. 296 : 84—93.

Suda T., Nagata S. 1994. Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. J. Exp. Med. 179 : 873—877.

Takamatsu M., Fujita T., Hotta H. 2001. Suppression of serum starvation-induced apoptosis by hepatitis C virus core protein. Kobe J. Med. Sci. 112 : 97—112.

Tanaka M., Itai T., Adachi M., Nagata S. 1998. Downregulation of Fas ligand by shedding. Nat. Med. 4 : 31—36.

Van Engeland M., Nieland L. J. W., Ramaekers F. C. S. 1998. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. Cytometry. 31 : 1—9.

Wuchter C., Ruppert V., Schrappe M. 2002. *In vitro* susceptibility to dexamethasone- and doxorubicin-induced apoptotic cell death in context of maturation stage, responsiveness to interleukin 7, and early cytochrome reduction *in vivo* in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. Blood. 99 : 4109—4115.

Поступила 22 III 2006

MODULATION OF PROGRAMMED DEATH OF THE PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES UNDER CHRONIC VIRUS INFECTION

O. B. Zhukova,¹ N. V. Ryazantseva, V. V. Novitskiy, T. T. Radzivil,
L. S. Litvinova, N. Yu. Chasovskikh

SEI HPE Siberian State Medical University, Health Department of the Russian Federation, Tomsk;

¹ e-mail: cnil@mail.ru

We investigated programmed death of lymphocytes in patients with chronic infections — tick-borne encephalitis, hepatitis B and C. It has been shown that the character of disorders in realization of lymphocyte apoptosis depends on molecular features of the infectious agent. Apoptotic death of lymphocytes was elevated after incubation *in vitro* with dexamethasone, etoposide and in medium without serum. Receptor-dependent and mitochondrial paths of apoptotic signal conduction are preferentially modulated under chronic virus persistence.

Key words: lymphocyte, chronic virus infection, apoptosis, modulation, Fas-receptor, TNF-receptor, mitochondrial membrane potential.